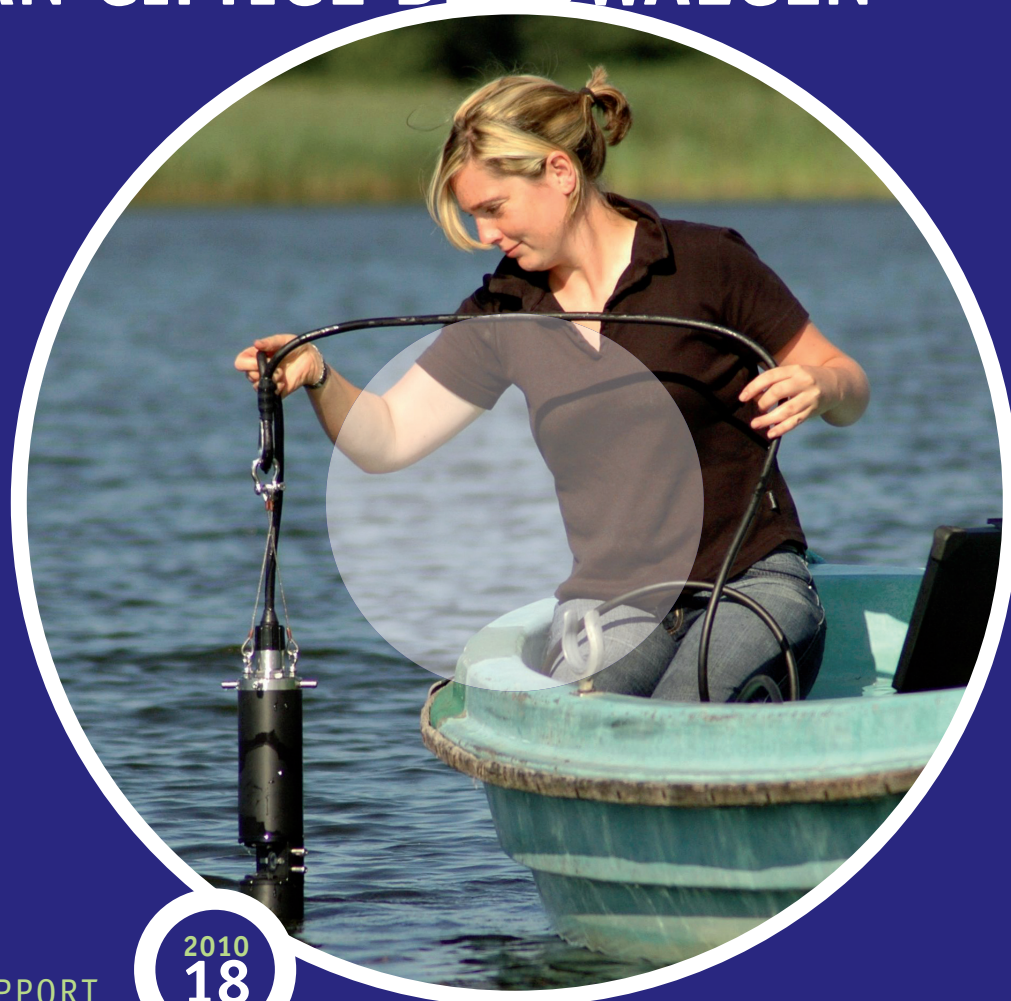


# TOEPASSING VAN FLUORESCENTIE BIJ DE BEOORDELING VAN DE RISICO'S VAN GIFTIGE BLAUWALGEN



RAPPORT

2010  
18

TOEPASSING VAN FLUORESCENTIE BIJ DE BEOORDELING  
VAN DE RISICO'S VAN GIFTIGE BLAUWALGEN

STOWA

2010

18

ISBN 978.90.5773.474.8



# COLOFON

Amersfoort, april 2010

UITGAVE STOWA, Amersfoort

AUTEUR Ron van der Oost Waternet

## KLANKBORDGROEP

Werkgroep Cyanobacteriën:

Hans Ruiter, Waterdienst

Tineke Burger, RWS – IJsselmeergebied

Petra Visser, Universiteit van Amsterdam

Jasper Stroom, Waternet

Marieke Euwe, Wetterskip Fryslân

Guido Waajen, Waterschap Brabantse Delta

Henk Tamerus, Waterschap De Dommel

Ciska Schets, RIVM - MGB

Cees Collé, Provincie Gelderland

Mike Lurling, Wageningen Universiteit

Miguel Dionisio, Deltares

Johan Oosterbaan, Hoogheemraadschap van Rijnland

Michelle Talsma, STOWA

Bas van der Wal, STOWA

Ron van der Oost, Waternet

Arco Wagenvoort, AqWa

Bart Schaub, Hoogheemraadschap Rijnland

## BETROKKEN WATERBEHEERDERS

Waternet

Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier

Hoogheemraadschap van Rijnland

## FOTO OMSLAG

microLAN BV

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau

STOWA rapportnummer 2010-18  
ISBN 978.90.5773.474.8

# TEN GELEIDE

Cyanobacteriën, meestal blauwalgen genoemd, kunnen door de productie van giftige stoffen problemen veroorzaken in zwemwateren. Het monitoren van de risico's van giftige blauwalgen is echter een complexe zaak. Verschillende soorten blauwalgen kunnen zeer veel verschillende gifstoffen produceren, waarvan de toxiciteit voor een groot deel nog onbekend is. Om die reden kan niet worden volstaan met een eenvoudige chemische analyse.

De werkgroep Cyanobacteriën van STOWA heeft tegen deze achtergrond in 2008 een risicoanalyse voorgesteld die is gebaseerd op de richtwaarde van de Wereld Gezondheidsorganisatie. Deze richtwaarde geeft getallen voor blauwalgcellen in het water, waarboven nadelige effecten voor de zwemmers kunnen ontstaan. De meest voor de hand liggende methode om dit te bepalen, microscopische celtelling, is echter een tijdrovende en dure methode. Daarom heeft STOWA het initiatief genomen voor onderzoek naar een sneller en goedkoper alternatief: fluorescentiemetingen. Het betreft een methode voor analyse van het chlorofyl-a van blauwalgen (cyano-chlorofyl), gemeten via fluorescentie. In het onderzoek is de relatie onderzocht tussen fluorescentiemetingen, celaantallen en biovolumes van blauwalgen.

Op basis van de uitkomsten van dit onderzoek adviseert de werkgroep Cyanobacteriën om blauwalgenmonitoring uit te gaan voeren met behulp van een fluorescentieanalyse van het cyano-chlorofyl. In het blauwalgenprotocol voor 2010 is een aantal aanbevelingen uit dit rapport opgenomen.

Utrecht, april 2009

De directeur van de STOWA  
Ir. J.M.J. Leenen

# SAMENVATTING

## AANLEIDING & DOEL

Het monitoren van de risico's van giftige blauwalgen is een complexe zaak. Omdat verschillende soorten blauwalgen een zeer groot aantal gifstoffen kunnen produceren, waarvan de toxiciteit nog voor een groot deel onbekend is, kan niet worden volstaan met een eenvoudige chemische analyse. De werkgroep Cyanobacteriën (Cyano werkgroep) heeft daarom een risicoanalyse voorgesteld die is gebaseerd op de richtwaarde van de Wereld Gezondheidsorganisatie (WHO, 1999) voor het aantal blauwalgen waarboven nadelige effecten voor zwemmers kunnen optreden. Omdat microscopische celtelling hiervoor een tijdrovende en dure methode is, is er in 2008 en 2009 onderzoek uitgevoerd naar de toepasbaarheid van een sneller en goedkoper alternatief.

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of fluorescentie metingen als alternatief voor microscopische celtellingen kunnen worden gebruikt bij de blauwalgen monitoring. Het betreft een methode voor analyse van het chlorofyl-a van blauwalgen (cyano-chlorofyl), gemeten via fluorescentie. In het onderzoek is de relatie onderzocht tussen fluorescentiemetingen, celaantallen en biovolumes van blauwalgen.

## WERKWIJZE & RESULTATEN

De fluorescentie metingen voor dit onderzoek werden uitgevoerd met een bbe Moldaenke Fluoroprobe, die specifieke fluorescentie signalen automatisch omrekent naar chlorofylgehalten van vier groepen fytoplankton: groenalgen, diatomeeën, cryptofyten en blauwalgen. De robuustheid van de fluorescentie analyse is goed. De lineariteit in het meetbereik van 0 tot 400 µg chlorofyl per liter en de herhaalbaarheid van de analyse van een standaard controle monster bleken uitstekend te zijn. Er is een significante lineaire relatie gevonden tussen de totaal-chlorofyl resultaten van de fluorescentie analyse en de NEN-6520 analyse. De NEN-chlorofylgehalten waren iets hoger dan de gehalten die met de sensor waren bepaald, maar hierop kan de Fluoroprobe worden gekalibreerd.

De toepasbaarheid van de fluorescentiemethode bij de screening en de risicoanalyse van blauwalgen werd getoetst door vergelijking met microscopische analyses van de celdichtheid en het biovolume van blauwalgen in verschillende datasets. De relatie tussen de blauwalgen celdichtheid en fluorescentie (cyano-chlorofyl) bleek matig tot slecht. Bij verschillende datasets werden bovendien zeer uiteenlopende verhoudingen gevonden tussen de celdichtheid en het cyano-chlorofyl. Uit de zeer grote verschillen tussen celdichtheden die in gelijke monsters werden bepaald door drie gerenommeerde laboratoria bleek dat de microscopische analyse niet robuust is.

De lineaire relatie tussen het cyano-chlorofyl en het microscopisch bepaalde biovolume (berekend uit celtellingen) bleek wel goed te zijn. Op grond van de fluorescentie kon een betrouwbare schatting worden gemaakt van het biovolume van de blauwalgen. De verhouding tussen cyano-chlorofyl en blauwalgen biovolume was bovendien zeer constant voor de verschillende onderzochte datasets.

De resultaten van de fluorescentie analyses en het microscopische onderzoek zijn ook vergeleken met analyses van de blauwalgen gifstof microcystine. Voor geen van de onderzochte variabelen werd een lineaire relatie aangetoond met dit cyanotoxine, zelfs als alleen de locaties met een dominantie van het geslacht *Microcystis* in beschouwing werden genomen. Dit kan verklaard worden doordat van de toxische geslachten niet alle soorten toxines produceren en de toxineproductie in de giftige soorten variabel is. Geen van de onderzochte methoden lijkt daarom een goede maat voor de actuele risico's van de blauwalgen, maar het zijn indicatoren voor de aanwezigheid van blauwalgen, meestal met overschatting van de risico's.

#### CONCLUSIES & AANBEVELINGEN

Op basis van dit onderzoek kan geconcludeerd worden dat fluorescentiemetingen een goede maat zijn voor het biovolume van blauwalgen in veldmonsters. Het is daarmee een goede methode voor de screening van zwemwater op blauwalgen. Voor een risicoanalyse van blauwalgen is echter altijd een aanvullende (kwalitatieve) microscopische fytoplanktonanalyse nodig om na te gaan of er potentieel toxische blauwalgen aanwezig zijn.

De huidige blauwalgen monitoringmethoden zijn niet in staat alle risico's voor recreanten goed in beeld te brengen. De microcystineanalyse is niet geschikt voor alle soorten blauwalgen die in Nederland worden gevonden; met de overige methoden wordt *wel* de aanwezigheid maar *niet* het risico van blauwalgen bepaald. De normen die de WHO heeft aangegeven voor risico's van blauwalgen in recreatiewater, zijn celdichtheid (100.000 cellen/ml), microcystine (20 µg/L) en cyano-chlorofyl (50 µg/L). Het blauwalgenprotocol uit 2008 hanteert als norm voor een zwemverbod 200.000 cellen/ml. Met de in dit onderzoek gevonden lineaire relatie tussen cyano-chlorofyl en blauwalgen biovolume kan een norm voor het blauwalgen biovolume worden afgeleid van 10 mm<sup>3</sup>/L. Als de totale dataset wordt onderzocht op deze vier normoverschrijdingen, dan zien we dat de microcystine norm het minst vaak wordt overschreden. Verreweg de meeste overschrijdingen worden gevonden op grond van de celdichtheid. De normen op basis van cyano-chlorofyl en biovolume worden meer dan microcystine maar minder dan de celdichtheid overschreden.

Naar aanleiding van deze studie beveelt de Cyano werkgroep aan de normen voor risico's van blauwalgen in het blauwalgenprotocol aan te passen. De risicoanalyse kan beter niet worden uitgevoerd op basis van blauwalgen celdichtheid. De werkgroep adviseert normen op basis van cyano-chlorofyl of biovolume vast te stellen. De blauwalgenmonitoring kan hierbij zowel met microscopisch onderzoek als fluorescentie worden uitgevoerd. Toepassing van fluorescentie heeft de voorkeur, omdat deze methode minder foutgevoelig is dan de celtelling. Bij een cyano-chlorofylgehalte hoger dan 5 µg/L, wordt geadviseerd een kwalitatief microscopisch onderzoek uit te voeren om de dominante soorten blauwalgen te bepalen.

De Cyano werkgroep adviseert om na 2010 de risicoanalyse van blauwalgen uitsluitend te baseren op drijflagen, biovolume en cyano-chlorofyl. De voorgestelde normen en acties zijn weergegeven in de onderstaande tabel. Deze normen kunnen in de toekomst met voortschrijdend inzicht worden aangepast.

| Normen & acties  | drijfhoogte | biovolume<br>mm <sup>3</sup> /L | cyano-chlorofyl<br>µg/L |
|--|-------------|---------------------------------|-------------------------|
| 1. Verhoogde alertheid (wekelijks monitoren, microscopisch onderzoek toxische soorten) | categorie 1 | 1                               | 5                       |
| 2: Waarschuwing plaatsen   | categorie 2 | 5                               | 25                      |
| 3: Negatief zwemadvies afgeven (extreme gevallen zwemverbod)                           | categorie 3 | 10                              | 50                      |

Inmiddels heeft het Nationaal Water Overleg (NWO) een blauwalgenprotocol voor 2010 vastgesteld waarin een aantal aanbevelingen uit dit rapport al is overgenomen. Volgens dit protocol kunnen de risico's voor zwemmers zowel op basis van celdichtheid, biovolume als cyano-chlorofyl worden beoordeeld. De normen voor een negatief zwemadvies (zwemverbod) liggen hoger dan die in de bovenstaande tabel.

De Cyano werkgroep adviseert om de kwaliteit van de blauwalgen monitoring te toetsen met een ringonderzoek waarbij de fluorescentie analyse en het microscopische onderzoek worden vergeleken. In alle voor dit ringonderzoek aangeboden monsters moet een breed pakket aan toxine analyses worden uitgevoerd om de relevantie van de uitkomsten te kunnen toetsen. Om in de toekomst een meer relevante monitoring van de blauwalgen risico's uit te kunnen voeren, wordt aanbevolen om onderzoek te doen naar de ontwikkeling van een effectgericht monitoring systeem met bioassays. Dit om de mogelijke risico's van cyanotoxines voor lever, zenuwstelsel en cellen te analyseren. Hierop zal een toekomstig systeem voor de risicoanalyse van blauwalgen moeten worden gebaseerd.

# DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonedig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n 6,5 miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 033 - 460 32 00.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 2180, 3800 CD Amersfoort.

Email: [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl).

Website: [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)





# TOEPASSING VAN FLUORESCENTIE BIJ DE BEOORDELING VAN DE RISICO'S VAN GIFTIGE BLAUWALGEN

## INHOUD

|            |   |          |
|------------|---|----------|
|            | TEN GELEIDE   |          |
|            | SAMENVATTING  |          |
|            | STOWA IN HET KORT   |          |
| <b>1</b>   | <b>INLEIDING</b>  | <b>1</b> |
| <b>2</b>   | <b>UITVOERING VAN HET ONDERZOEK</b>                                   | <b>3</b> |
| <b>2.1</b> | Kalibratie van de fluorescentie voor blauwalgen monitoring            | 3        |
| <b>2.2</b> | Methoden  | 4        |
| 2.3.1      | Fluorescentie analyse   | 4        |
| 2.3.2      | NEN-6520 analyse van chlorofyl  | 5        |
| 2.3.3      | ELISA analyse van microcystine  | 5        |
| 2.3.4      | Microscopische Quicksan blauwalgen                                    | 6        |
| 2.3.5      | Celtelling en biovolume blauwalgen                                    | 6        |
| 2.3.6      | Statistiek  | 7        |
| <b>3</b>   | <b>RESULTATEN</b>   | <b>8</b> |
| <b>3.1</b> | Betrouwbaarheid van de fluorescentie analyse                          | 8        |
| 3.1.1      | Lineariteit   | 8        |
| 3.1.2      | Herhaalbaarheid   | 8        |
| 3.1.3      | Vergelijking met fluorescentie en spectrofotometrie bepaald chlorofyl | 9        |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2   | Kalibratie van de Fluoroprobe voor celdichtheid en biovolume                       | 11 |
| 3.2.1 | Analyse van blauwalgen monoculturen van de Universiteit van Amsterdam (STOWA 2008) | 11 |
| 3.2.2 | Analyse van de STOWA 2008 dataset  | 12 |
| 3.2.3 | Analyse van de EWACS 2008 dataset  | 13 |
| 3.2.4 | Analyse van de Rijnland 2008 dataset   | 15 |
| 3.2.5 | Analyse van de HHNK/Waternet 2009 dataset  | 16 |
| 3.2.6 | Analyse van de totale dataset  | 17 |
| 3.3   | Relaties tussen blauwalgen aanwezigheid en microcystine                            | 23 |
| 4     |  |    |
|       | DISCUSSIE  | 24 |
| 4.1   | Betrouwbaarheid van de fluorescentie analyse                                       | 24 |
| 4.2   | Kalibratie van de Fluoroprobe voor celdichtheid en biovolume                       | 25 |
| 4.3   | Relaties tussen blauwalgen aanwezigheid en microcystine                            | 26 |
| 4.4   | Toepassing van fluorescentie bij de blauwalgen monitoring                          | 27 |
| 5     |  |    |
|       | CONCLUSIES & AANBEVELINGEN   | 31 |
| 5.1   | Conclusies   | 31 |
| 5.2   | Aanbevelingen  | 31 |
| 6     |  |    |
|       | LITERATUUR   | 33 |
|       |  |    |
|       | BIJLAGEN:  |    |
| 1     | RESULTATEN BLAUWALGEN ONDERZOEK RIJNLAND   | 36 |
| 2     | RESULTATEN CHLOROFYL ANALYSES WATERNET (TERRA NOVA) 2008                           | 38 |
| 3     | RESULTATEN VERGELIJKEND ONDERZOEK BLAUWALGEN MONITORING STOWA 2008                 | 39 |
| 4     | RESULTATEN BLAUWALGEN ONDERZOEK EWACS 2008   | 40 |
| 5     | RESULTATEN BLAUWALGEN ONDERZOEK HHNK/WATERNET 2009                                 | 41 |
| 6     | STATISTISCHE ONDERBOUWING VAN HET ONDERZOEK (DR. THEO JANSE, WATERNET)             | 42 |

# 1

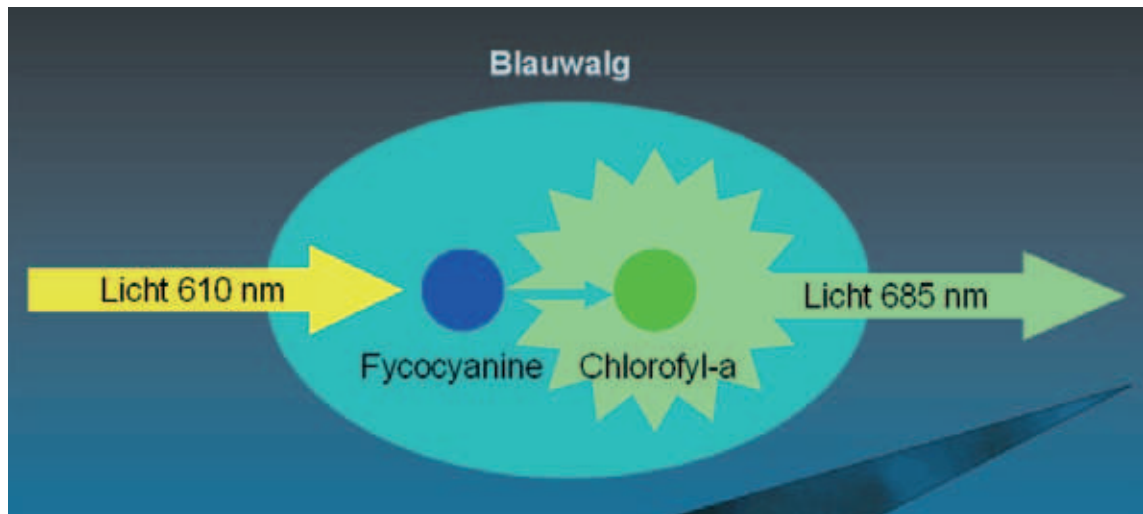
## INLEIDING

De risicoanalyse voor de aanwezigheid van toxische blauwalgen werd tot voor kort uitgevoerd volgens het algemeen geldende protocol van de Commissie Integraal Waterbeheer (CIW, 2002). Hierbij werd de meest voorkomende gifstof, microcystine, geanalyseerd. Omdat er steeds meer soorten blauwalgen in de Nederlandse wateren voorkomen, die een breed scala aan gifstoffen kunnen produceren, is de analyse van alleen microcystine onvoldoende voor een betrouwbare schatting van de risico's voor de zwemmers. De werkgroep Cyanobacteriën (Cyano werkgroep) heeft daarom een alternatieve risicoanalyse voorgesteld die is gebaseerd op het aantal blauwalgen van vijf potentieel toxische geslachten: *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Woronichinia*. De Wereld Gezondheidsorganisatie WHO heeft in 1999 richtwaarden vastgesteld van 100.000 blauwalgen cellen per ml en 50 µg cyano-chlorofyl per liter, waarboven nadelige effecten voor de zwemmers kunnen ontstaan. Deze richtwaarden waren gebaseerd op de hoeveelheden *Microcystis* cellen of chlorofyl die ongeveer overeen kwam met een concentratie van 20 µg/L van de gifstof microcystine (de oude CIW-norm).

Het protocol van de Cyano werkgroep (2008) is gebaseerd op de WHO richtwaarde voor celdichtheid. De WHO norm van 100.000 cellen/ml voor een hoog risico is aangepast door de Cyano werkgroep, omdat deze gebaseerd was op een *worst-case* benadering voor het aantal *Microcystis* cellen per ml dat 20 µg microcystine kan bevatten. Omdat de celgrootte van blauwalgen zeer variabel kan zijn is het microcystinegehalte bij 100.000 *Microcystis* cellen in de meeste gevallen veel lager. Op grond van dit voortschrijdende inzicht heeft de cyano werkgroep besloten om een twee maal hogere norm vast te stellen voor een negatief zwemadvies op grond van de celdichtheid. De beoordeling van de risico's met dichtheden van blauwalgen is een ruwe benadering omdat voor de risicoanalyse vooral de concentraties gifstoffen van belang zijn. Omdat het tellen van cellen voor de globale risicoanalyse een arbeidsintensieve en dure methode is, werd er in 2008 en 2009 onderzoek uitgevoerd naar een goedkoper alternatief, de fluorescentie analyse met een blauwalgen sensor. Met deze methode kunnen de verschillende soorten blauwalgen niet worden onderscheiden, maar het is wel mogelijk om onderscheid te maken tussen verschillende groepen fytoplankton (blauwalgen, groenalgen, diatomeeën & dinoflagellaten en cryptofyten) (Beutler et al, 2002). Het principe van de fluorescentie analyse bij blauwalgen is schematisch weergegeven in Figuur 1. Ingestraald licht met een golflengte van ca. 610 nm wordt geabsorbeerd door fycocyanine, de karakteristieke kleurstof van blauwalgen. De energie van deze lichtabsorptie wordt door het fotosyntheseapparaat zeer efficiënt aan chlorofyl-*a* overgedragen. Hierna wordt de energie door het chlorofyl-*a* omgezet in lichtuitstraling (fluorescentie), die gevoelig kan worden gedetecteerd door de Fluoroprobe. De officiële naam voor blauwalgen, cyanobacteriën, is gebaseerd op de naam van de kleurstof fycocyanine. De kleurstoffen die specifiek zijn voor de andere typen fytoplankton absorberen licht van andere golflengten.

FIGUUR 1

SCHEMA VAN HET PRINCIPE VAN DE FLUORESCENTIE ANALYSE VAN CYANO-CHLOROFYL. LICHTINSTRALING (610 NM) LEIDT TOT EEN HOGER ENERGIELEVEL VAN HET FYCOCYANINE VAN BLAUWALGEN. DE ENERGIE VAN HET FYCOCYANINE WORDT OVERGEDRAGEN AAN CHLOROFYL DAT HIERDOOR GAAT FLUORESCEREN (LICHTUITSTRALING VAN 685 NM), HETGEEN WORDT GEDETECTEERD DOOR DE FLUOROPROBE.



In 2007 is er door een aantal waterschappen al een verkennend onderzoek uitgevoerd met een fluorescentie sensor. De resultaten leken veelbelovend, maar het kalibreren van de sensor om het fluorescentie signaal te vertalen naar celdichtheden bleek lastig te zijn. Daarom is er in 2008 en 2009 aanvullend onderzoek uitgevoerd om de fluorescentiemethode verder te ontwikkelen. De hypothese van dit onderzoek is dat de screening en de risicoanalyse van blauwalgen kan worden uitgevoerd met een combinatie van kwantitatieve analyse met een gevalideerde en gestandaardiseerde fluorescentiemethode en kwalitatieve microscopische analyse (soortensamenstelling). De screening op blauwalgen is een analyses van de mogelijke aanwezigheid van blauwalgen als er nog geen drijflaag zichtbaar is. In het blauwalgenprotocol van 2008 komt dit overeen met een celdichtheid van 20.000 cellen/ml. Bij grotere dichtheden blauwalgen moet er een risicoanalyse worden uitgevoerd om gezondheidsklachten bij zwimmers te voorkomen. In het blauwalgenprotocol van 2008 zijn celdichtheden opgenomen van 50.000, 100.000 en 200.000 cellen/ml, waarboven maatregelen moeten worden genomen.

In dit onderzoek is de mogelijkheid voor toepassing van de fluorescentie analyse bij de blauwalgen monitoring beoordeeld. Eerst is de robuustheid van de fluorescentie analyse getoetst door de lineariteit en de herhaalbaarheid te onderzoeken en de resultaten te vergelijken met de NEN-6520 analyse van chlorofyl (2006). Daarna is de toepasbaarheid van de fluorescentiemethode bij de screening en de risicoanalyse van blauwalgen getoetst door vergelijking met microscopische analyses van de celdichtheid en het biovolume van blauwalgen. Daarnaast zijn de resultaten vergeleken met analyses van de blauwalgen gifstof microcystine. Het onderzoek is uitgevoerd met gekweekte blauwalgen en met veldmateriaal uit 2007, 2008 en 2009 van diverse locaties (datasets van STOWA, Waternet, Rijnland en Hollands Noorderkwartier).

# 2

## UITVOERING VAN HET ONDERZOEK

Alle fluorescentie metingen die in dit rapport zijn opgenomen zijn geanalyseerd op de bbe Moldaenke Fluoroprobe II. Deze Fluoroprobe rekent vier specifieke fluorescentie signalen automatisch om naar chlorofylgehalten van vier soorten fytoplankton: blauwalgen, groenalgen, diatomeeën en cryptofyten. Voor dit onderzoek zijn vooral de chlorofylgehalten van blauwalgen (cyano-chlorofyl) bestudeerd. Alle metingen met de blauwalgen sensor werden op het laboratorium uitgevoerd. Allereerst werd de robuustheid van de fluorescentie analyse getoetst. Daarna werden de relaties met blauwalgen celdichtheid & biovolume en met de concentraties van de gifstof microcystine onderzocht. Voor het onderzoek werden vier soorten blauwalgen gebruikt die op de Vrije Universiteit van Amsterdam (UvA) waren gekweekt. Daarnaast werden veldgegevens van het STOWA onderzoek, het EWACS project en onderzoek van de waterschappen Rijnland, Waternet en Hollands Noorderkwartier gebruikt.

### 2.1 KALIBRATIE VAN DE FLUORESCENTIE VOOR BLAUWALGEN MONITORING

Voor de blauwalgen kalibratie van STOWA werd een vergelijkend onderzoek uitgevoerd met de blauwalgen sensor (fluorescentie), microscopische quickscan, microscopische analyse van de blauwalgen celdichtheid en het blauwalgen biovolume en een ELISA microcystine analyse. Bij dit onderzoek werd getest in hoeverre een combinatie van kwalitatief microscopisch onderzoek en kwantificeren met fluorescentie de resultaten van de microscopische celtelling kunnen benaderen. Bij de datasets van de overige onderzoeken zijn niet alle bovenstaande parameters geanalyseerd. In een aantal datasets werd ook een spectrofotometrische chlorofyl analyse uitgevoerd.

De werking van de Fluoroprobe is in eerste aanleg onderzocht met de vier belangrijkste giftige blauwalgen die in Nederland voorkomen: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Planktothrix*. Deze blauwalgen waren afkomstig van de kweken van het Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica van de Universiteit van Amsterdam (UvA). Bij dit onderzoek werd nagegaan of er grote verschillen waren tussen de verschillende soorten blauwalgen.

Naast de kalibraties met gekweekte blauwalgen werden voor het STOWA 2008 onderzoek metingen uitgevoerd op veldmateriaal. Het materiaal was afkomstig van risicolocaties voor blauwalgen (volgens de zwemwaterprofielen en/of op grond van ervaring). Er werden 28 monsters geanalyseerd waarvan de celaantallen tussen de 10.000-2.000.000 per ml werden geschat. De keuze van de monsters voor de STOWA serie die voor biovolume en celdichtheid analyses werden uitbesteed werd gemaakt op basis van Fluoroprobe analyses, microcystine gehalten en quickscan analyses. Achteraf bleken relatief veel van deze monsters een celdichtheid te hebben die veel hoger was dan de normen die moeten worden getoetst om de risico's voor zwemmers te analyseren (20.000-200.000 cellen/ml). De dataset die voor de kalibratie werd onderzocht is daarom uitgebreid met resultaten van vergelijkbaar onderzoek dat werd uitgevoerd door andere Nederlandse waterbeheerders. Voor het EWACS onderzoek naar de

voorspelling van drijfslagen (Early Warning Against Cyano Scums) is in 2008 een grote serie monsters onderzocht met de Fluoroprobe en met de microscoop (celdichtheid en biovolume). Omdat dit onderzoek wekelijks werd uitgevoerd (ook als er geen zichtbare problemen met blauwalgen waren) waren hier veel waarnemingen met lagere celdichtheden bij. Dit gold ook voor de dataset Rijnland 2008 (Vlietland). Het reguliere onderzoek van Waternet en Hollands Noorderkwartier (2009) werd met name uitgevoerd in monsters met hoge blauwalgen celdichtheden. De datasets van Rijnland (Vlietland) en Waternet (Terra Nova) zijn vooral gebruikt om de Fluoroprobe chlorofyl analyse te vergelijken met de spectrofotometrische chlorofyl analyse volgens NEN-6520 (versie 2006).

## 2.2 METHODEN

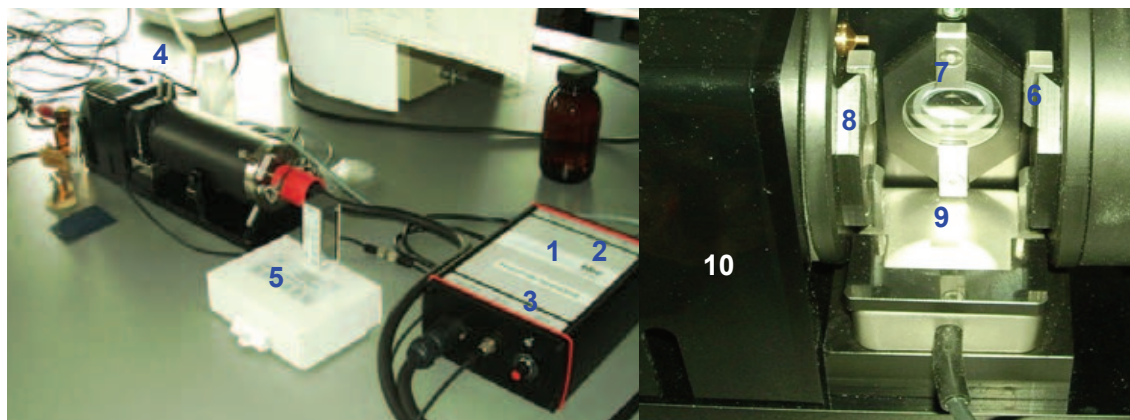
De fluorescentie (sensor) analyse, de microscopische quickscan en de ELISA microcystine analyse van de STOWA 2008, Terra Nova 2008 en HHNK/Waternet 2009 onderzoeken werden alle uitgevoerd op het laboratorium van Waterproef in Edam. De meeste microscopische celtellingen en biovolume analyses werden uitbesteed bij Het Waterlaboratorium (HWL). Daarnaast is er een grote serie metingen van het EWACS project onderzocht. De Fluoroprobe analyses van deze monsters werden uitgevoerd bij Waterproef (Sloterplas) en HH Rijnland (Westeinderplassen). De microscopische analyses van de celdichtheid en het biovolume van de EWACS monsters werden uitgevoerd door respectievelijk Aqualab en Koeman & Bijkerk. De monsters van het Rijnland 2008 Vlietland onderzoek zijn met de Fluoroprobe geanalyseerd op het lab van Rijnland en microscopisch geanalyseerd door bureau Waterkant. Om de betrouwbaarheid van de celtelling te onderzoeken zijn vier goed gehomogeniseerde monsters van de UvA kweek verdeeld en onderzocht op blauwalgen celdichtheid en biovolume door drie erkende laboratoria (HWL, Koeman & Bijkerk en Aqualab). De spectrofotometrische chlorofyl-a analyses werden uitgevoerd bij het Laboratorium van Rijnland en het Waterproef laboratorium.

### 2.3.1 FLUORESCENTIE ANALYSE

De fluorescentie analyses in dit rapport zijn alle uitgevoerd met de laboratoriumversie van de Fluoroprobe II van bbe Moldaenke (Figuur 2), volgens het door de fabrikant opgegeven protocol. De Fluoroprobe is door de fabrikant standaard gekalibreerd op chlorofylgehalten. Allereerst is gecontroleerd of de instellingen van het apparaat goed zijn door een nulmeting met afgeschermd lichtbron en een blanco meting met demi water uit te voeren. Als de instellingen afwijken van respectievelijk 0% en 100% transmissie wordt het apparaat hiervoor opnieuw gekalibreerd. Aan de hand van het meetsignaal na instraling met 4 LED's (verschillende specifieke golflengten), wordt met behulp van een ingevoerde constante een beste *fit* berekend, waarbij een schatting van het aandeel van de vier algengroepen wordt gemaakt. Het meetsignaal wordt uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  chlorofyl/l, met een aantal omrekeningen en aannames die door de gebruiker bijgesteld kunnen worden. De monsters werden voor de analyses in het donker bewaard. De metingen worden uitgevoerd door 25 ml van een monster in het kwarts meetcuvet te brengen en hiervan 12 maal de fluorescentie te meten. De fluorescentie waarden worden door het apparaat automatisch omgerekend naar chlorofylgehalten. De resultaten worden opgeslagen op de computer en de gemiddelde waarden worden berekend met een zelfgeschreven Excel dataverwerking programma.

FIGUUR 2

DE BBE MOLDAENKE FLUOROPROBE II; 1. VOEDING; 2. AAN/UIT SCHAKELAAR; 3. REGELAAR ROERSNELHEID; 4. CUVETKAMER MET MEETGEDEELTE VOOR 25 ML CUVET; 5. KALIBRATIECUVET (ALLEEN GEBRUIKT BIJ RIJNLAND) 6. TRANSMISSIE VENSTER; 7. LED VENSTER; 8. DETECTOR VENSTER; 9. CUVETHOUDER; 10. AFSCHERMKAP



### 2.3.2 NEN-6520 ANALYSE VAN CHLOROFYL

De chlorofyl-*a* gehalten van de monsters van Rijnland (Vlietland) en Waternet (Terra Nova) werd ook geanalyseerd met de spectrofotometrische analyse volgens de NEN-6520 norm (NEN, 2006) "Water - Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-*a*". De NEN-6520 norm beschrijft een spectrofotometrische methode voor de bepaling van het gehalte aan chlorofyl-*a* als een maat voor de hoeveelheid fytoplankton in oppervlaktewater. Uitgaande van een monstervolume van een liter kunnen chlorofyl-*a* gehalten vanaf ca. 4 µg/L worden bepaald. Het watermonster wordt binnen 24 uur gefiltreerd over een glasvezelfilter. Dit filter wordt geëxtraheerd met warme 90% ethanol. Het afgekoelde extract wordt gefiltreerd of gecentrifugeerd, waarna de extinctie van het heldere extract wordt bepaald bij 750 nm ( $E_0$ ) en 665 nm ( $E_x$ ). Na aanzuren met zoutzuur tot pH 2,6-2,8 worden nogmaals de extincties bepaald bij dezelfde golflengten ( $E'_0$  en  $E'_x$ ). Het chlorofylgehalte (CHL) wordt berekend met de gemeten extincties volgens de formule:

$$\text{CHL} = 296 * [E_N - E_Z] * V_1 / [V_0 * L],$$

waarin:

$$E_N = E_x - E_0$$

$$E_Z = E'_x - E'_0$$

$$V_0 = \text{volume watermonster [L]}$$

$$V_1 = \text{volume toegevoegd ethanol [ml]}$$

$$L = \text{lichtweg in meetcuvet [mm]}$$

### 2.3.3 ELISA ANALYSE VAN MICROCYSTINE

Voor de microcystine (MYC) ELISA analyses (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) analyse werden de monsters voorbehandeld volgens het standaard protocol van de Cyano werkgroep. Een ml van een gehomogeniseerd watermonster wordt overgebracht in een 3 ml cryogeen vaatje. Hieraan wordt 1 ml methanol toegevoegd. De afgesloten 'cryovial' wordt met een polystyreen of schuimrubber houder 30 minuten geëxtraheerd in een kokend waterbad. Na de extractie wordt verdund met demiwater tot binnen het meetbereik van de ELISA (0,1 – 1,6 µg MYC/L). Daarna wordt 100 µl van het verdunde extract in een vaatje van de SDI EnviroGard® Microcystins Plate kit gepipetteerd. De microtiterplaten van deze kit zijn voorzien van microcystine antilichamen, waaraan een groot aantal microcystines en nodularines binden. Op de microtiterplaat wordt ook een microcystine standaard reeks geanalyseerd van 0 tot 1,6 µg/L.



Na 30 minuten incubatie wordt een enzym conjugaat toegevoegd dat bindt aan de antilichamen die nog niet bezet zijn met microcystine. Na 30 minuten incuberen worden de platen 5 maal gewassen met demiwater. Na het wassen wordt de kleurreactie gestart door toevoeging van 100 µl substraatoplossing microtiterplaat. De kleurreactie wordt na 30 minuten gestopt door toevoeging van 100 µl stop-oplossing. Binnen 30 minuten na het stoppen van de kleurreactie wordt de optische dichtheid (OD) gemeten in een Tecan Spectra Fluorplus microplaterader. De microcystinegehalten worden bepaald door toetsing aan de ijklijn met een zelfgeschreven Excel programma voor dataverwerking. Alle analyses van monsters en standaarden worden in duplo uitgevoerd. Voor de kwaliteitscontrole worden als voorwaarden voor een goede analyse gesteld dat de variantie van de OD metingen kleiner is dan 10% en dat de ijklijn voldoet aan het criterium  $R^2 > 0,98$ .

#### 2.3.4 MICROSCOPISCHE QUICKSCAN BLAUWALGEN

Van een goed gemengd watermonster wordt 40 ml afgenomen en 15 minuten gecentrifugeerd bij een toerental van 2000 omwentelingen per minuut. De bovenstaande vloeistof wordt afgezogen en het residu wordt overgebracht in een puntbuis met een maatverdeling, gecentrifugeerd en afgezogen tot 0,5 ml. Na goed mengen van het achtergebleven bezinksel wordt één druppel hiervan met een pasteurpipet op een objectglas gebracht. Het objectglas wordt afgesloten met een dekglasje, zodanig dat er geen luchtballen achterblijven. Het preparaat wordt onder de microscoop bekeken bij een vergroting van 400x. Er worden 10 tot 20 beeldvelden bekeken, afhankelijk van de dichtheid, totdat een goed overzicht is verkregen. De algen worden kwalitatief bestudeerd en semi-kwantitatief beoordeeld volgens onderstaande legenda:

| <i>klasse</i>  | <i>omschrijving</i>   |
|----------------|---|
| 1. Zeer weinig | ca. 1-5 individuen in de totaalopname                               |
| 2. Weinig      | ca. 6-10 individuen in de totaalopname                              |
| 3. Matig       | ca. 2-5 individuen per beeldveld of 11-30 in de in de totaal opname |
| 4. Veel        | ca. 15-30 individuen per beeldveld                                  |
| 5. Zeer veel   | ca. 30 individuen per beeldveld                                     |

De getelde individuen kunnen cellen, draden of kolonies zijn. Bij aanwezigheid van een drijf-laag van blauwwieren wordt eerst 0,4 ml lugol toegevoegd aan 40 ml. Door toevoegen van lugol bezinken de blauwwieren veel beter zodat ze niet worden afgezogen, waardoor de bepaling nauwkeuriger wordt. Een half uur na de lugol toediening kan het bovenstaande protocol worden uitgevoerd.

#### 2.3.5 CELTELLING EN BIOVOLUME BLAUWALGEN

De analyse van de celdichtheid en het biovolume van blauwalgen werden uitgevoerd volgens de quickscan blauwalgen behorend bij het Blauwalgenprotocol 2008 (Cyano werkgroep). Dit voorschrift is gebaseerd op de NEN-EN 14996 Richtlijn voor de kwaliteitsborging van biologische en ecologische beoordelingen in het aquatische milieu en de NEN-EN 15204 Waterkwaliteit - Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek). Voor de tellingen werden de monsters geconserveerd met lugol. Monsters met een dominantie van Microcystis kolonies worden met KOH behandeld om de cellen uit de kolonies vrij te maken (alleen toegepast bij Aqualab tellingen). Als de algen concentratie van het monster te hoog of te laag is voor een celtelling dan moet er respectievelijk worden verdund met demiwater of geconcentreerd door bezinken of centrifugeren. De monsters moeten goed worden gehomogeniseerd door ze 20 seconden te schudden. Daarna wordt een bekende hoeveelheid in het meetcuvet gebracht, dat wordt afgedekt met een dek-

glaasje. Een optimale concentratie algen voor een celtelling ligt tussen de 10 en 20 cellen per beeldveld, bij een vergroting tussen 200x en 800x. Er worden altijd meerdere beeldvelden geteld (afhankelijk van de concentratie blauwalgen). Door omrekening van het getelde water-volume kan de celdichtheid worden uitgedrukt in cellen per ml. Voor de bepaling van het biovolume wordt onder de microscoop het gemiddelde volume van de cellen van een bepaalde algensoort bepaald door de lengte, de breedte en de vorm van een aantal representatieve cellen te meten. Daarna worden de celaantallen van die soort vermenigvuldigd met het geometrisch gemiddelde volume zodat het biovolume van de soort kan worden uitgedrukt als  $\text{mm}^3$  per liter (Carpentier et al., 1999). Door sommeren van de data van alle blauwalgen soorten worden de totale celdichtheden en biovolumina bepaald.

### 2.3.6 STATISTIEK

De in Excel bepaalde correlatiecoëfficiënten ( $R^2$  waarden) zijn bepaald met lineaire regressie van de trendlijn die door het nulpunt loopt. De  $R^2$  waarden zijn een maat voor de sterkte van de correlaties en kunnen variëren van -1 voor een perfecte negatieve correlatie tot +1 voor een perfecte positieve correlatie.  $R^2$  waarden dicht bij 0 geven aan dat er geen correlatie tussen de parameters wordt aangetoond. De voor deze studie meest relevante datasets zijn bovendien statistisch geanalyseerd met het programma Statgraphics Plus. Bij deze analyse zijn de lineaire correlaties tussen de data onderzocht, zonder de optie dat de lineaire regressielijn door het nulpunt hoeft te lopen. Hierdoor kunnen de correlatiecoëfficiënten verschillen met die van de Excel analyse. Met Statgraphics Plus werd de significantie van de lineaire relatie tussen de data bepaald. Daarnaast werden ook de 95% betrouwbaarheidsintervallen van de regressielijnen en van de met lineaire regressie voorspelde data geanalyseerd. Alle resultaten van de Statgraphics Plus analyses (uitgevoerd door dr. Theo Janse van Waternet) zijn weergegeven in Bijlage 6.

# 3

## RESULTATEN

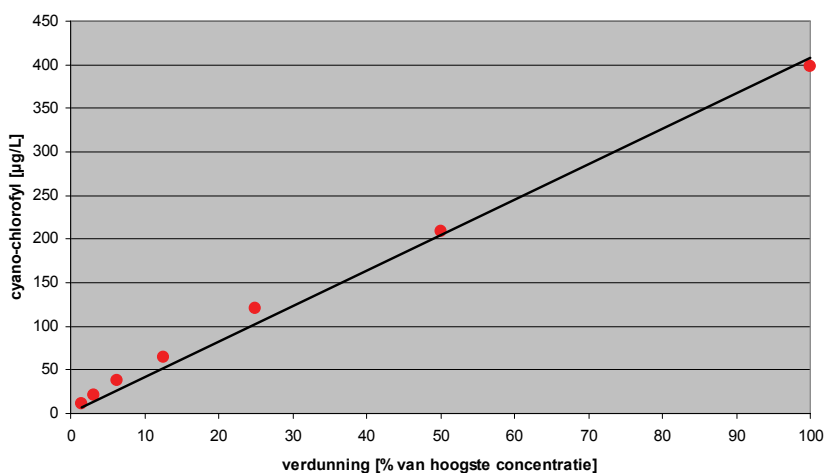
### 3.1 BETROUWBAARHEID VAN DE FLUORESCENTIE ANALYSE

Als de fluorescentie analyse wordt ingezet voor het monitoren van de aanwezigheid van blauwalgen en de risico's hiervan voor zwemmers moet de methode voldoende robuust zijn. Om de kwaliteit van de analyses te toetsen zijn daarom analyses uitgevoerd naar de lineariteit en de herhaalbaarheid (reproduceerbaarheid) van de methode.

#### 3.1.1 LINEARITEIT

Om de lineariteit van de methode te onderzoeken zijn fluorescentie analyses uitgevoerd op een veldmonster met *Mycrocystis* dominantie dat meerdere malen is verdund. De resultaten van deze test zijn weergegeven in figuur 3. De lineariteit van de analyses in het gebied van 0 tot 400 µg cyano-chlorofyl per liter blijkt zeer goed te zijn. Bij chlorofylgehalten boven de 400 µg/L geeft het apparaat aan dat er een "invalid result" is gemeten, hetgeen betekent dat het monster moet worden verdund om het te kunnen meten. In het gehele meetbereik kunnen met de bbe Fluoroprobe dus betrouwbare fluorescentie analyses worden uitgevoerd. Omdat het mogelijk is dat er met andere apparatuur minder goede resultaten worden gevonden moet voor elk type fluorescentiemeter een dergelijke lineariteit-test worden uitgevoerd.

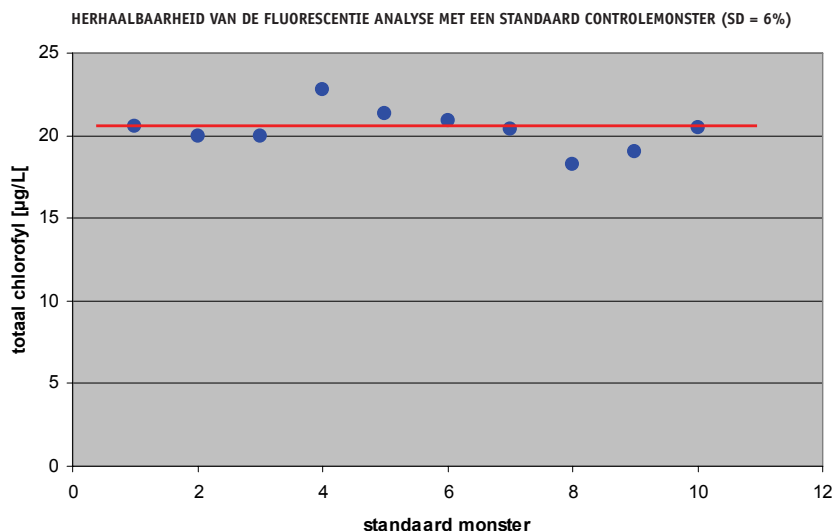
FIGUUR 3 LINEARITEIT VAN DE FLUORESCENTIE ANALYSE MET DE BBE FLUOROPROBE; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 4.1 * X$ ;  $R^2 = 0.99$



#### 3.1.2 HERHAALBAARHEID

De herhaalbaarheid van de Fluoroprobe analyse is bepaald door op verschillende dagen de fluorescentie van een standaard controlemonster (25 mg chlorella poeder/L) te bepalen. Uit de grafiek van figuur 4 blijkt dat de herhaalbaarheid of reproduceerbaarheid van de analyse goed is, met een standaard deviatie van 6%.

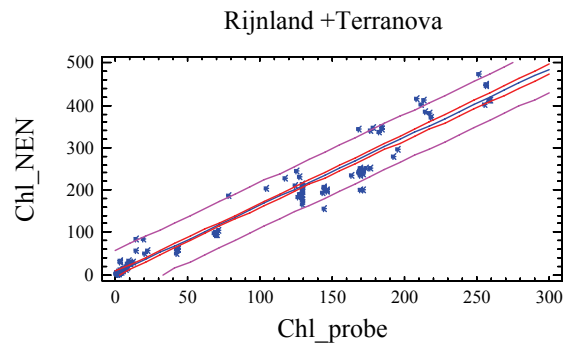
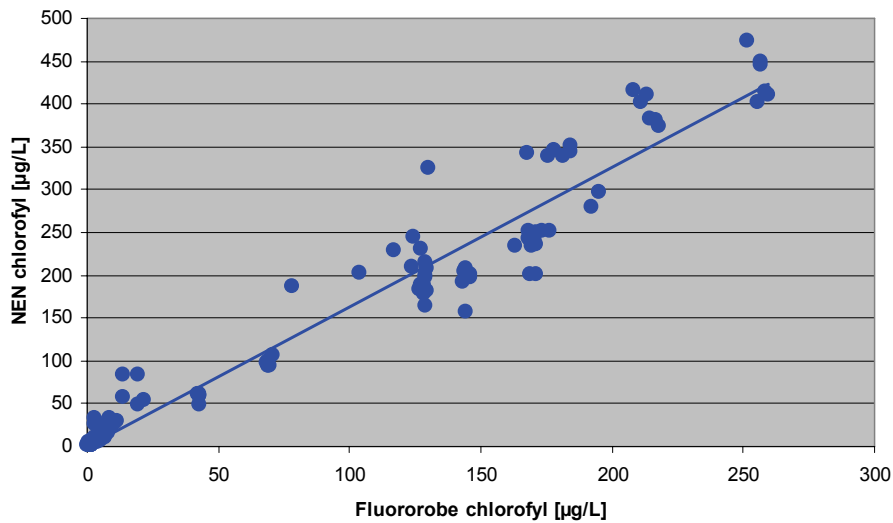
FIGUUR 4



### 3.1.3 VERGELIJKING MET FLUORESCENTIE EN SPECTROFOTOMETRIE BEPAALD CHLOROFYL

Een vergelijking met de chlorofylgehalten die spectrofotometrisch zijn bepaald met de NEN-6520 methode biedt een mogelijkheid om fluorescentie gegevens van laboratoria die met verschillende fluorescentie apparatuur werken onderling te kalibreren. In een gezamenlijk onderzoek van Rijnland, Schieland en Krimpenerwaard zijn de NEN en fluorescentiemethoden uitgebreid met elkaar vergeleken. Er werd een significante correlatie waargenomen waarbij het NEN-chlorofyl 1.1 tot 1.7 maal hoger was dan de met fluorescentie bepaalde totaal chlorofylgehalten (Schaub, 2007). Bij een recente analyse van de Rijnland dataset van 2008 bleek deze verhouding een stuk hoger te zijn, waarschijnlijk omdat er alleen zeer lage gehalten werden gemeten (rond de detectiegrenzen van de NEN analyse). In het Terra Nova onderzoek van Waternet werd een verhouding NEN:probe CHL van 1,7 gevonden. Als de data van de beide datasets (Bijlagen 1 en 2) worden gecombineerd wordt een significante lineaire relatie gevonden, met een NEN:probe verhouding van 1,6 (Figuur 5).

FIGUUR 5 RELATIE TUSSEN TOTAAL CHLOROFYL BEPAALD MET DE FLUOROPROBE EN MET DE NEN-6520 METHODE; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 1,6 * X$ ;  $R^2 = 0,94$ . ONDER: STATGRAPHICS ANALYSE VAN DE 95% BETROUWBAARHEIDS-INTERVALLEN VAN DE REGRESSIELIJN (ROOD) EN DE VOORSPELDE DATA (PAARS)



Met Statgraphics werd een lineaire correlatie gevonden met de vergelijking:  $NEN\text{-chlorofyl} = 1,61 + 1,61 * \text{probe-chlorofyl}$ . Er is een significant lineair verband aantoonbaar tussen het NEN-chlorofyl en het met de probe bepaalde chlorofyl ( $p < 0,0001$ ), met een hoge betrouwbaarheid. Met een kleinste kwadraten analyse werd bepaald dat 96% van de variatie in NEN-chlorofyl met de lineaire vergelijking wordt verklaard. Hoewel er met een ANOVA analyse een significante *lack-of fit* (ontbreken van een lineaire samenhang) wordt aangetoond is het lineaire model geschikt om de relatie te beschrijven. Met een meer complex model (*Multiplicative*) correleren de data iets beter ( $R^2 = 0,97$  vs.  $R^2 = 0,96$ ). Uit de Statgraphics analyse blijkt dat 95% betrouwbaarheidsintervallen van zowel de regressielijn als de lineaire relatie relatief klein zijn (figuur 5, onder). Met dit betrouwbaarheidsinterval kan de waarde van een voorspelling met dit model worden beoordeeld. Bij een probe-chlorofylgehalte van 259  $\mu\text{g/L}$  wordt bijvoorbeeld een NEN-chlorofyl van 420  $\mu\text{g/ml}$  voorspeld, met variaties tussen 365 en 475  $\mu\text{g/L}$  (13% afwijking). Met het probe-chlorofyl kan dus een zeer betrouwbare schatting worden gemaakt van het volgens NEN geanalyseerde chlorofyl.

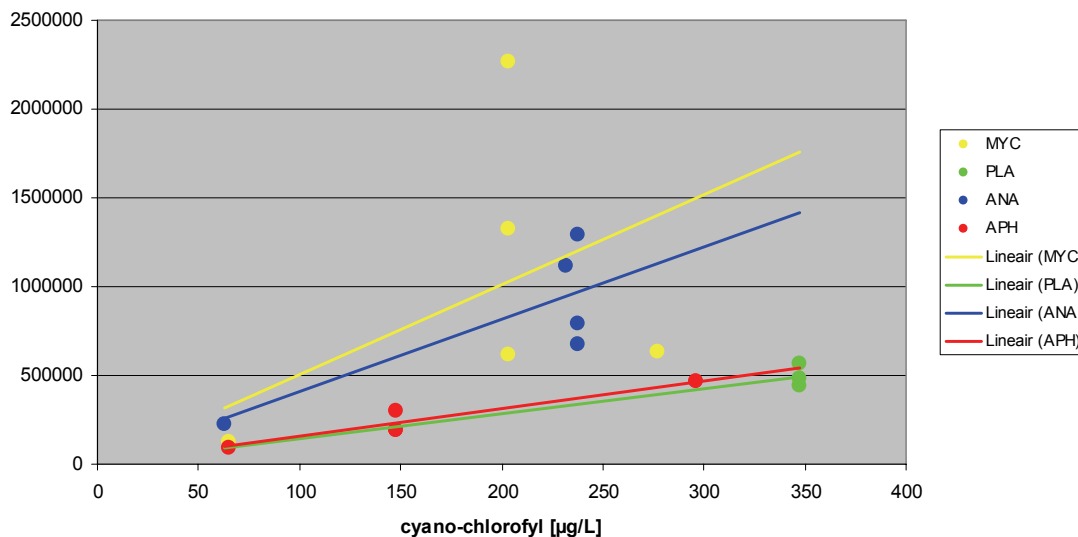
### 3.2 KALIBRATIE VAN DE FLUOROPROBE VOOR CELDICHTHEID EN BIOVOLUME

Om het verband tussen de fluorescentie van chlorofyl uit blauwalgen (cyano-chlorofyl) te vergelijken met de microscopisch bepaalde aantallen blauwalgen (celdichtheid) en het blauwalgen biovolume werden de verschillende datasets geanalyseerd op correlaties tussen deze parameters. Voor deze analyse werden de datasets van het STOWA fluorescentie onderzoek 2008 (Bijlage 3), het EWACS (Early Warning Against Cyano Scums) onderzoek 2008 (Bijlage 4) het Rijnland onderzoek 2007-2008 (Bijlage 1) en het reguliere onderzoek van HHNK en Waternet 2009 (Bijlage 5) gebruikt.

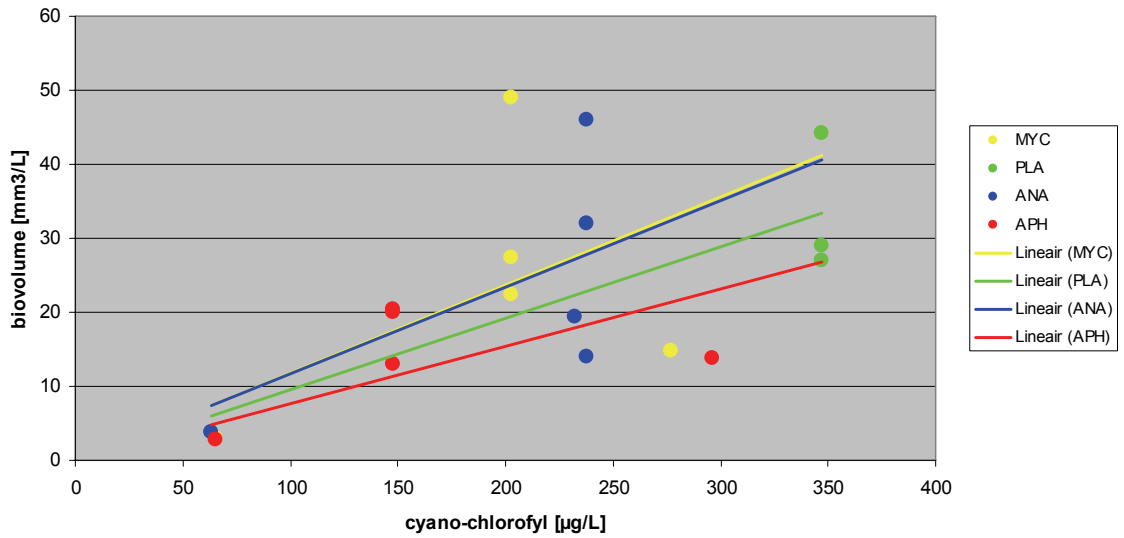
#### 3.2.1 ANALYSE VAN BLAUWALGEN MONOCULTUREN VAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM (STOWA 2008)

Om de invloed van soortverschillen te onderzoeken is in eerste aanleg getracht de Fluoroprobe chlorofyl analyse te kalibreren met verschillende soorten blauwalgen die op de Universiteit van Amsterdam (UvA) waren gekweekt. Er zijn verdunningen van vier culturen gemaakt. De waarden van de UvA monsters uit Bijlage 3 zijn uitgezet in de grafieken van de Figuren 6 en 7. Uit de grafieken blijkt duidelijk dat er voor deze serie metingen weinig lineair verband kan worden aangetoond tussen de chlorofylgehalten van de verschillende blauwalgen en de celdichtheid en het biovolume. De grote variatie wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door de grote spreiding tussen de celdichtheden en de biovolumina die op de drie verschillende laboratoria werden bepaald (zie Tabel 1). Deze verschillen zijn het grootst voor *Microcystis* en *Anabaena*. De lineaire trendlijnen tonen aan dat de soortverschillen voor correlaties met celdichtheid groter zijn dan voor de correlaties met biovolume.

FIGUUR 6 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID BIJ OP DE UVA GEKWEekte BLAUWALGEN; MYC = *MICROCYSTIS* (GEEL):  $Y = 5075 \cdot X$ ;  $R^2 = 0.12$ ; PLA = *PLANKTOTHRIX* (GROEN):  $Y = 1425 \cdot X$ ;  $R^2 = 0$ ; ANA = *ANABAENA* (BLAUW):  $Y = 4080 \cdot X$ ;  $R^2 = 0.63$  EN APH = *APHANIZOMENON* (ROOD):  $Y = 1560 \cdot X$ ;  $R^2 = 0.90$



FIGUUR 7 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN BIOVOLUME BIJ OP DE UVA GEKWEekte BLAUWALGEN; MYC = *MICROCYSTIS* (GEEL):  $Y = 0.12 * X$ ;  $R^2 = 0.15$ ; PLA = *PLANKTOTHRIX* (GROEN):  $Y = 0.09 * X$ ;  $R^2 = 0$ ; ANA = *ANABAENA* (BLAUW):  $Y = 0.12 * X$ ;  $R^2 = 0.43$  EN APH = *APHANIZOMENON* (ROOD):  $Y = 0.08 * X$ ;  $R^2 = 0.18$



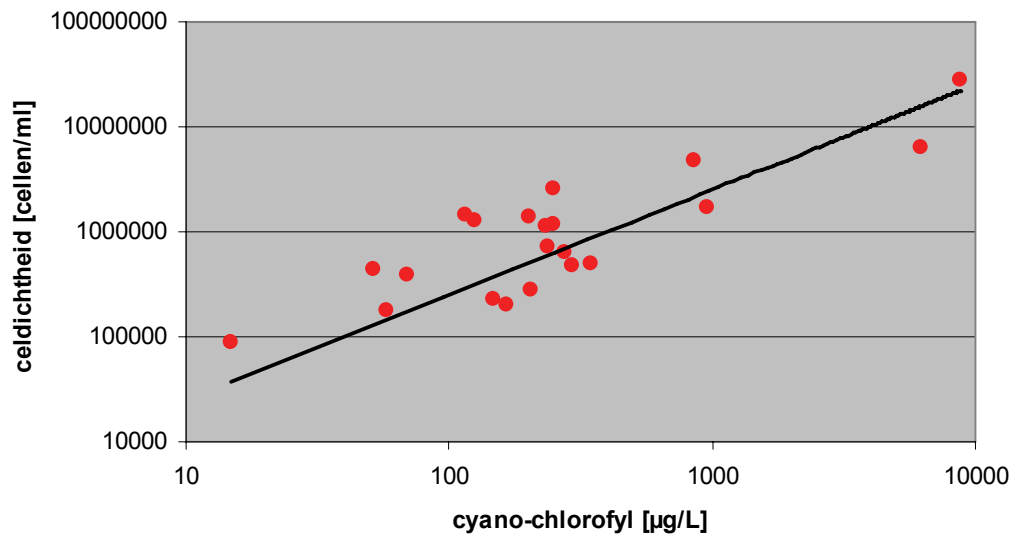
TABEL 1 BLAUWALGEN CELTELLING (CELLEN/ML) DOOR 3 VERSCHILLENDE LABORATORIA

| code               | MYC UvA | PLA UvA | ANA UvA | APH UvA |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|
| Lab 1              | 614000  | 481000  | 788000  | 188000  |
| Lab 2              | 1325000 | 565000  | 674000  | 303000  |
| Lab 3              | 2267000 | 438000  | 1293000 | 193000  |
| Gemiddelde         | 1402000 | 494000  | 918000  | 228000  |
| standaard deviatie | 59%     | 13%     | 36%     | 28%     |

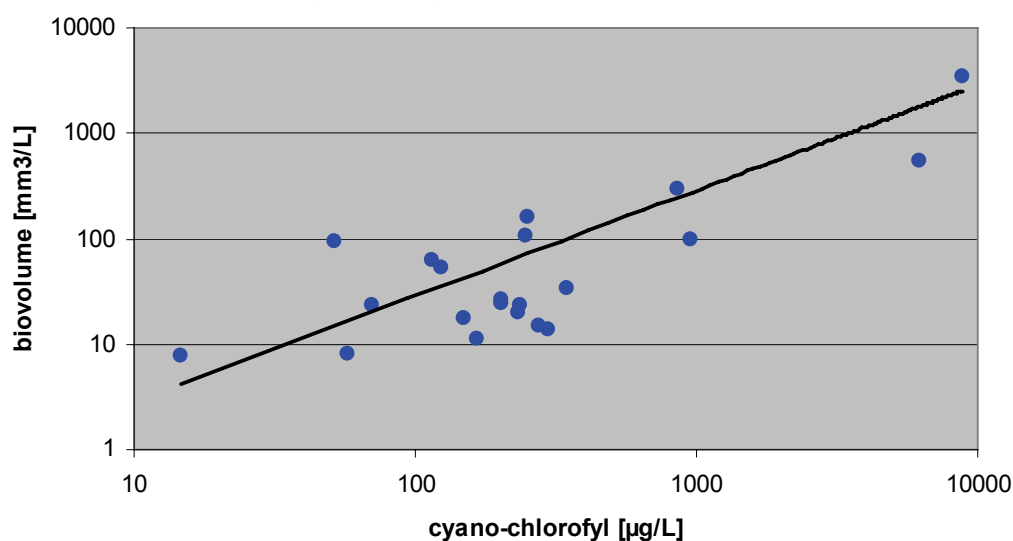
### 3.2.2 ANALYSE VAN DE STOWA 2008 DATASET

In Figuren 8 en 9 is de relatie tussen het cyano chlorofyl en respectievelijk de celdichtheid en het biovolume van blauwalgen weergegeven van de STOWA 2008 dataset (inclusief monsters van de UvA kweek). Dominante blauwalgen bij deze dataset waren de meest voorkomende giftige geslachten *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* en *Aphanizomenon*. Omdat de getallen sterk uiteen liepen zijn ze uitgezet op logaritmische schalen.

FIGUUR 5 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID VAN DE STOWA 2008 DATASET (LOG-LOG SCHAAL) ; TRENDLIJN DOOR NUL :  $Y = 2525 * X$ ;  $R^2 = 0.81$



FIGUUR 6 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN BIOVOLUME VAN DE STOWA 2008 DATASET (LOG-LOG SCHAAL) ; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 0.29 * X$ ;  $R^2 = 0.78$



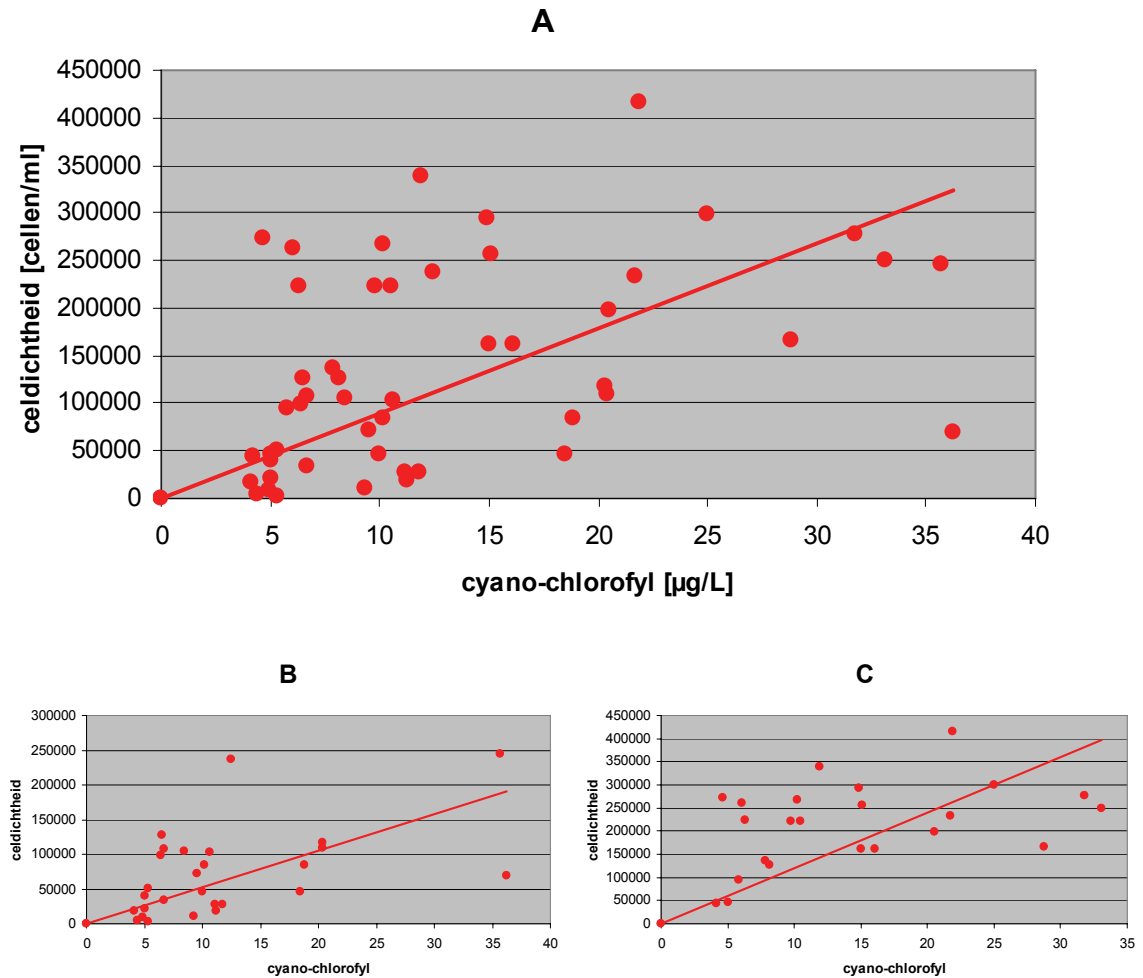
Op het eerste gezicht lijken er redelijke lineaire correlaties te bestaan tussen de Fluorescentie van cyano chlorofyl en zowel de celdichtheid als het biovolume van blauwalgen. Afwijkingen van het lineaire verband lijken echter kleiner door het gebruik van logaritmische schalen. De redelijk hoge positieve correlaties die in de Figuren 5 en 6 worden waargenomen tussen chlorofyl en celdichtheid ( $R^2 = 0,81$ ) of biovolume ( $R^2 = 0,78$ ), worden voor een belangrijk deel bepaald door de hoogste en de laagste waarden in de grafieken. In het middengebied (ca. 50-500  $\mu\text{g}$  chlorofyl/ml) lijkt er geen duidelijk verband zichtbaar tussen chlorofyl en de microscopisch bepaalde parameters. Voor de screening en de risicoanalyse van blauwalgen is het interessant om te zien of er een relatie kan worden aangetoond in het gebied met een blauwalgen celdichtheid tussen 5.000 en 250.000 cellen per ml. De met deze dataset berekende verhouding celdichtheid:chlorofyl is 2.500 en de verhouding biovolume:chlorofyl is 0,29.

### 3.2.3 ANALYSE VAN DE EWACS 2008 DATASET

Voor het onderzoek naar het EWACS voorspellingsmodel werden een aantal locaties wekelijks bemonsterd. Van twee locaties in de Sloterplas in Amsterdam (SBI025 en SBI026, Bijlage 4) en in de Westeinderplassen bij Aalsmeer (RO264 en RO865, Bijlage 4) zijn de monsters zowel met de Fluoroprobe (cyano chlorofyl) als microscopisch geanalyseerd (celdichtheid en biovolume van blauwalgen). Omdat hier niet alleen monsters werden genomen bij visueel waarneembare blauwalgen is deze dataset beter geschikt om de relaties in het voor de risicoanalyse interessante gebied (celdichtheid tussen 5.000 en 250.000 cellen per ml) te bestuderen. Dominante blauwalgen bij deze dataset waren de geslachten *Microcystis* & *Anabaena* (Sloterplas) en *Microcystis* & *Aphanizomenon* (Westeinderplassen). Omdat de spreiding tussen de data minder groot was dan bij de STOWA dataset kunnen de resultaten in de grafieken gewoon op een lineaire schaal worden weergegeven.

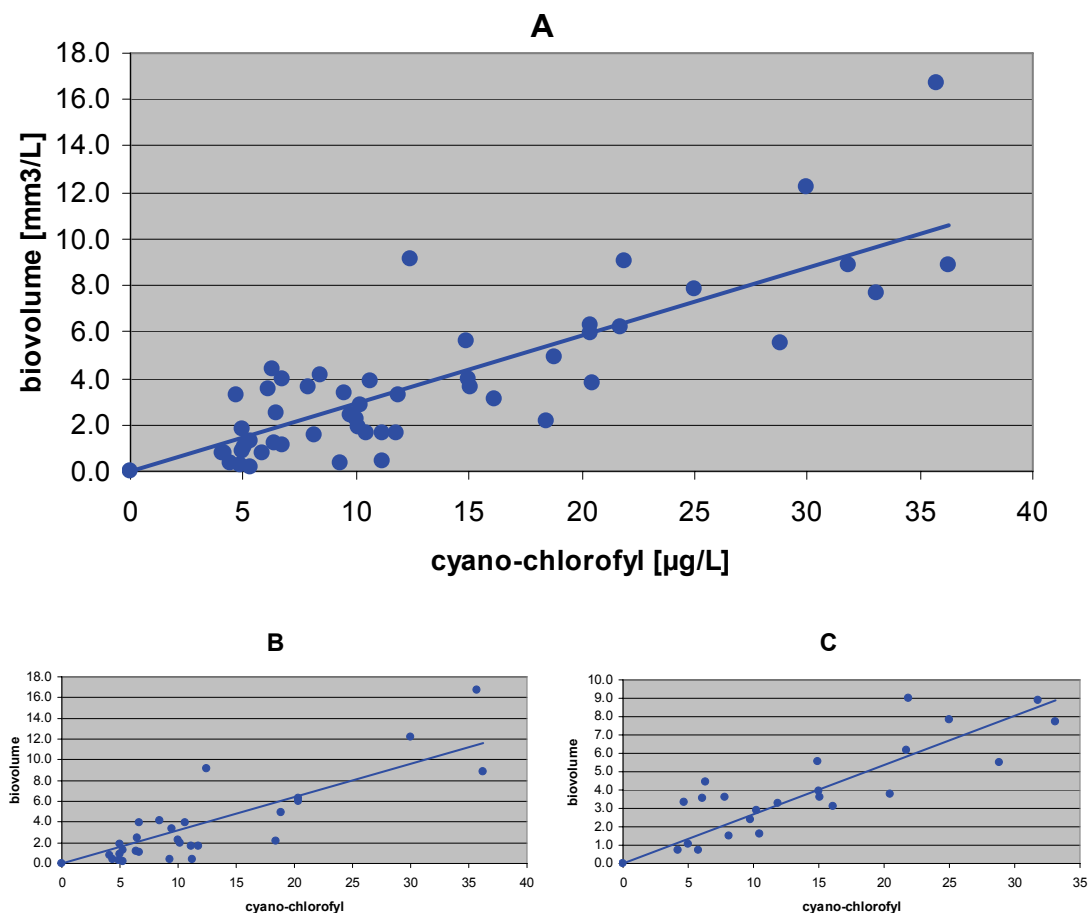


FIGUUR 8 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID VAN DE EWACS 2008 DATASET; TRENDLIJNEN DOOR NUL A. TOTAAL:  $Y = 8930 \cdot X$ ;  $R^2 = 0,07$ , B. SLOTERPLAS:  $Y = 5275 \cdot X$ ;  $R^2 = 0,22$  EN C. WESTEINDERPLASSEN:  $Y = 12000 \cdot X$ ;  $R^2 = 0,34$



Bij deze dataset is er een duidelijk verschil zichtbaar tussen de relaties van fluorescentie (cyano-chlorofyl) met de microscopisch bepaalde celdichtheden (Figuur 8) en biovolume (Figuur 9). Er is geen duidelijke correlatie tussen fluorescentie en celdichtheid, terwijl de correlatie tussen fluorescentie en biovolume van de totale dataset redelijk goed is (correlatie coëfficiënt totale dataset is 0,69). De met deze dataset berekende verhouding celdichtheid:chlorofyl is 8.900 en de verhouding biovolume:chlorofyl is 0,29. Er werden bij het EWACS onderzoek duidelijke verschillen aangetoond tussen de verhoudingen celdichtheid:chlorofyl van 5.300 en 12.000, die waren berekend met de datasets van respectievelijk de Slotterplas (Figuur 8B) en de Westeinderplassen (Figuur 8C). De verhoudingen biovolume:chlorofyl van de Slotterplas (Figuur 9B) en de Westeinderplassen (Figuur 9C) van respectievelijk 0,32 en 0,27 liggen veel dichter bij elkaar.

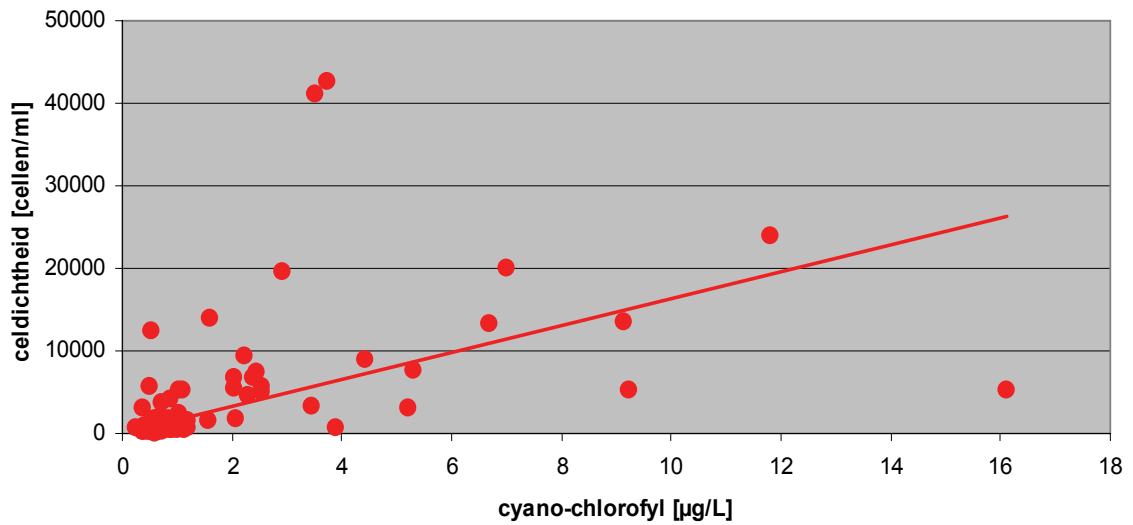
FIGUUR 9 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN BIOVOLUME VAN DE EWACS 2008 DATASET; TRENDLIJNEN DOOR NUL: A. TOTAAL:  $Y = 0.29 * X$ ;  $R^2 = 0.69$ , B. SLOTERPLAS:  $Y = 0.32 * X$ ;  $R^2 = 0.71$  EN C. WESTEINDERPLASSEN:  $Y = 0.27 * X$ ;  $R^2 = 0.70$



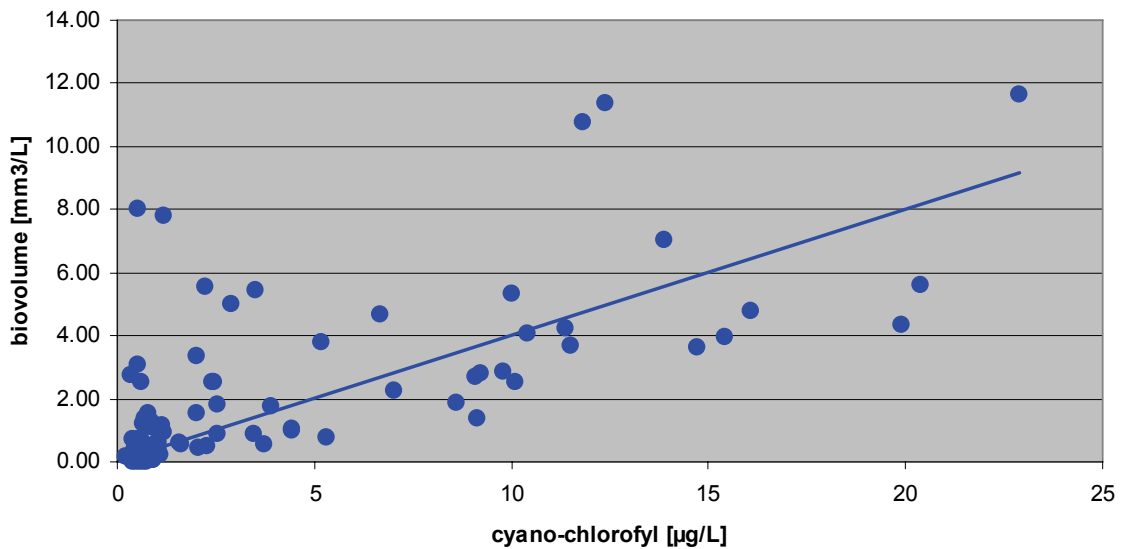
### 3.2.4 ANALYSE VAN DE RIJNLAND 2008 DATASET

Bij het Hoogheemraadschap van Rijnland zijn vanaf 2007 proeven uitgevoerd met een fytoplankton analyse met de Fluoroprobe. De cyano chlorofylgehalten werden vergeleken met de microscopisch bepaalde celdichtheid (Figuur 10) en het blauwalgen biovolume (Figuur 11). Dominante blauwalg bij deze dataset was het geslacht *Microcystis*, met in een aantal gevallen aanwezigheid van *Planktothrix* en *Aphanizomenon*. De lineaire correlatie tussen de fluorescentie en de celdichtheid is ook bij de Rijnland 2008 dataset niet goed. ( $R^2 = 0,16$ ). De berekende verhouding tussen de celdichtheid en het cyano-chlorofyl van 1630 is veel lager dan de verhoudingen die met de EWACS datasets werden gevonden. Door de late levering van de gegevens over de celdichtheid konden deze niet worden meegenomen in de gelimiteerde dataset die met Statgraphics is onderzocht (zie onderdeel 3.2.6). Voor de Rijnland 2007 & 2008 dataset is het verband tussen de met de Fluoroprobe bepaalde chlorofylgehalten en het microscopisch bepaalde blauwalgen biovolume minder goed dan met bij de overige datasets ( $R^2 = 0,41$ ). De verhouding tussen biovolume en cyano-chlorofyl is 0,40, wat iets hoger is dan de met de andere datasets gevonden verhoudingen. De Rijnland data van de biovolume werden eerder geleverd, zodat ze wel zijn opgenomen in de gelimiteerde dataset die met Statgraphics is onderzocht (zie onderdeel 3.2.6)

FIGUUR 10 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID VAN DE RIJNLAND DATASET UIT 2008; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 1630 \cdot X$ ;  $R^2 = 0.16$



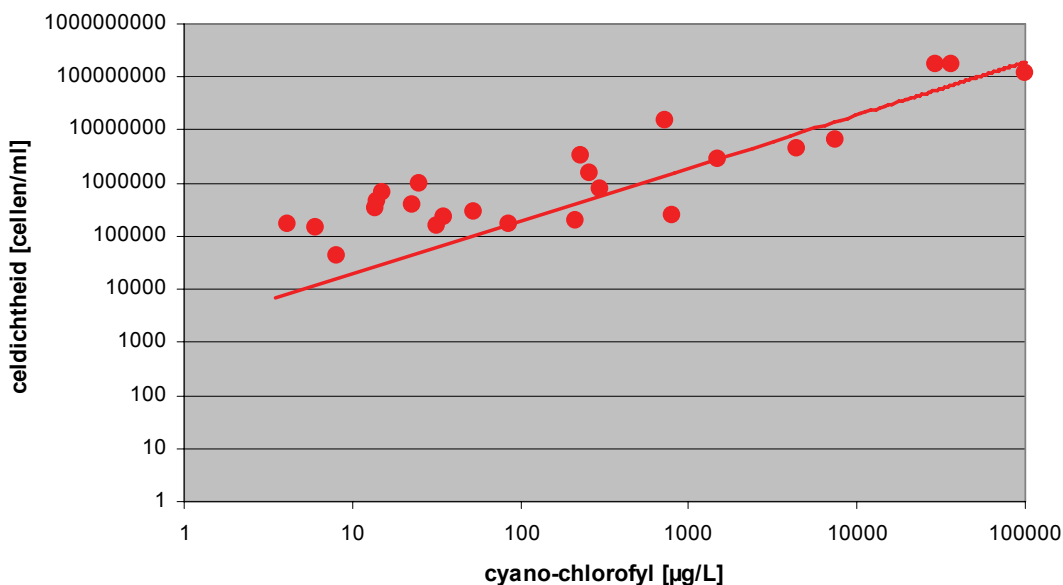
FIGUUR 11 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN BIOVOLUME VAN DE RIJNLAND DATASETS UIT 2007 EN 2008; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 0.40 \cdot X$ ;  $R^2 = 0.41$



### 3.2.5 ANALYSE VAN DE HHNK/WATERNET 2009 DATASET

In 2009 werden de monsters van enkele blauwalgen risicolocaties uit de beheersgebieden van Hoogheemraadschap Hollands Noorderkwartier (HHNK) en Waternet (WN) onderzocht met de Fluoroprobe. Alleen de monsters met een cyano-chlorofylgehalte hoger dan 4 werden microscopisch onderzocht. Dominante blauwalgen bij deze dataset waren de meest voorkomende giftige geslachten *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* en *Aphanizomenon*. Van de monsters met de hoogste hoeveelheden blauwalgen werd alleen de celdichtheid en geen biovolume bepaald. De relaties tussen de fluorescentie en de microscopisch bepaalde celdichtheden zijn weergegeven in Figuur 12. Door de grote spreiding in de gehalten moeten de resultaten op logaritmische schalen worden afgebeeld, waardoor de correlatie beter lijkt dan hij in werkelijkheid is. De met deze dataset berekende verhouding tussen celdichtheid en cyano-chlorofyl is 1910.

FIGUUR 12 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID VAN DE HHNK/WN DATASET UIT 2009 (LOG-LOG SCHAAL); TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 1910 * X$ ;  $R^2 = 0.54$



### 3.2.6 ANALYSE VAN DE TOTALE DATASET

In het nieuwe blauwalgenprotocol van de Cyano werkgroep worden de risico's van de zwemmers voor een belangrijk deel bepaald door het al of niet aanwezig zijn van drijflagen. Voor situaties met zeer hoge gehalten aan blauwalgen (categorie 2 of 3 drijflagen) is een visuele waarneming vaak al voldoende om de passende maatregelen te kunnen nemen. In deze gevallen zou nog microscopisch moeten worden onderzocht of de giftige blauwalgen dominant zijn (meestal het geval bij drijflagen), maar dit is niet in het protocol opgenomen. De risicoanalyse met andere methoden (toxineanalyse, celtelling of fluorescentie) is dus alleen relevant als er geen drijflagen zichtbaar zijn en bij soorten die geen drijflagen vormen, zoals *Planktothrix agardhii*. De niet-relevante monsters uit de totale dataset van vergelijkend fluorescentie en microscopisch onderzoek (Bijlagen 1, 3, 4 en 5) zijn daarom niet in beschouwing genomen om de relevantie voor de risicoanalyse te bepalen. De totale dataset is gelimiteerd tot de monsters die aan de volgende randvoorwaarden voldoen:

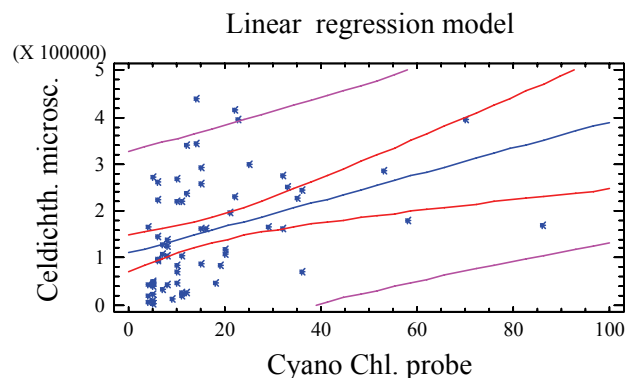
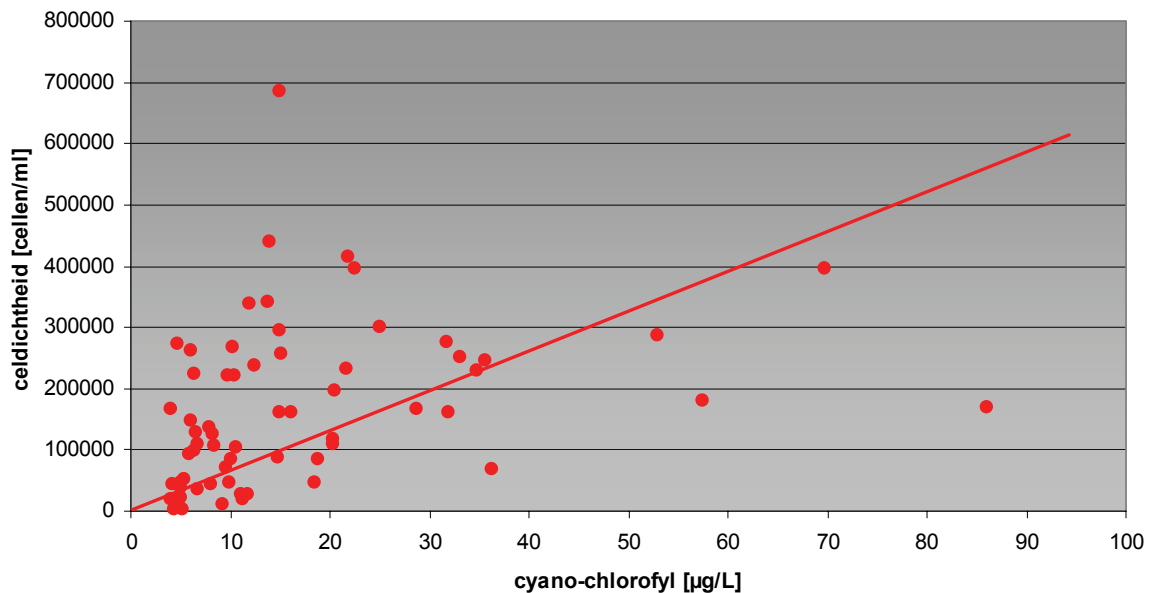
- concentratie cyano-chlorofyl lager dan 100 µg/L;
- celdichtheid blauwalgen kleiner dan 1.000.000 cellen/ml;
- biovolume blauwalgen kleiner dan 40 mm<sup>3</sup>/L.

Doordat de spreiding van resultaten van deze gelimiteerde dataset minder groot is kunnen de onderlinge relaties tussen fluorescentie en microscopie in de grafieken van Figuren 13 en 14 op lineaire schalen worden weergegeven. Een bijkomend voordeel van deze selectie is dat de monsters met de grootste kans op onnauwkeurigheden (o.a. door sterke verdunningen) buiten beschouwing worden gelaten. De relaties tussen de parameters van de gelimiteerde dataset zijn statistisch getoetst.

De relatie tussen de fluorescentie (cyano-chlorofyl) en de blauwalgen celdichtheid van de gelimiteerde dataset (64 waarnemingen) is weergegeven in figuur 13. Met Statgraphics werd een lineaire correlatie gevonden met de vergelijking: celdichtheid = 110.191 + 2800 \* cyano-chlorofyl. Er is weliswaar een significant lineair verband aantoonbaar tussen het cyano-chlorofyl en de hoeveelheid blauwalgen cellen ( $p < 0,01$ ), maar de betrouwbaarheid van deze

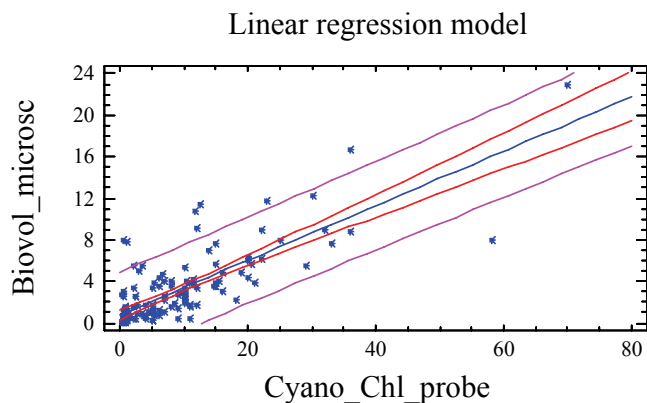
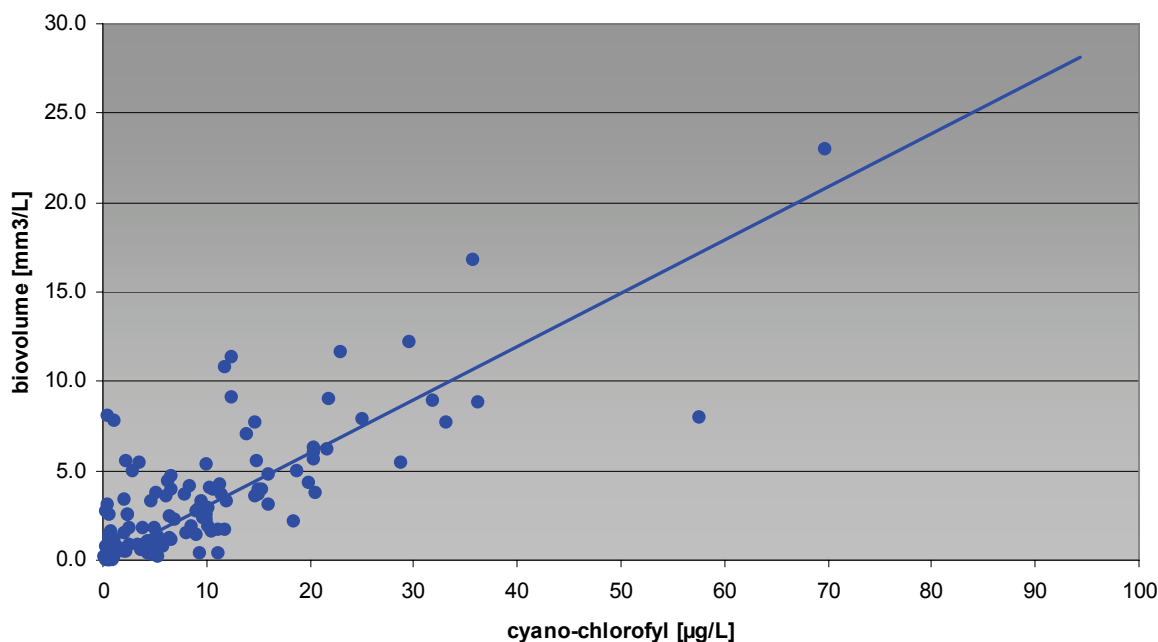
relatie is erg laag. Met een kleinste kwadraten analyse werd bepaald dat slechts 15% van de variatie in celdichtheid met de lineaire vergelijking wordt verklaard en dat er uit een ANOVA analyse bovendien een significante *lack-of fit* (ontbreken van een lineaire samenhang) wordt aangetoond voor de lineaire relatie. Uit deze analyse blijkt dat een meer complex model (*S-curve*) de samenhang tussen de data beter zal beschrijven. Uit de Statgraphics analyse blijkt dat 95% betrouwbaarheidsintervallen van zowel de regressielijn als de lineaire relatie zeer groot zijn (figuur 13, onder). Met het 95% betrouwbaarheidsinterval kan de waarde van een voorspelling met dit model worden beoordeeld. Bij een cyano-chlorofylgehalte van 86 µg/L wordt bijvoorbeeld een celdichtheid 351.000 cellen/ml voorspeld, met variaties tussen 105.000 en 597.000 cellen/ml (70% afwijking). Met het cyano-chlorofyl kan dus alleen een ruwe schatting worden gemaakt van de blauwalgen celdichtheid, maar deze schatting zal onvoldoende betrouwbaar zijn.

FIGUUR 13 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN CELDICHTHEID VAN DE TOTALE DATASET, GELIMITEERD TOT MONSTERS MET EEN GEMETEN CELDICHTHEID VAN MINDER DAN 1.000.000 CELLEN/ML; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 6503 * X$ ;  $R^2 = -0.28$ ; ONDER: STATGRAPHICS ANALYSE VAN DE 95% BETROUWBAARHEIDINTERVALLEN VAN DE REGRESSIELIJN (ROOD) EN DE VOORSPELDE DATA (PAARS).



De relatie tussen de fluorescentie (cyano-chlorofyl) en het blauwalgen biovolume van de gelimiteerde dataset (148 waarnemingen) is weergegeven in figuur 14. Met Statgraphics werd een lineaire correlatie gevonden met de vergelijking:  $\text{biovolume} = 0,74 + 0,26 * \text{cyano-chlorofyl}$ . Er is een duidelijk significant lineair verband aantoonbaar tussen het cyano-chlorofyl en het volume van de blauwalgen cellen ( $p < 0,0001$ ), met een redelijk hoge betrouwbaarheid. Met een kleinste kwadraten analyse werd bepaald dat 64% van de variatie in celdichtheid met de lineaire vergelijking wordt verklaard. Met een ANOVA analyse werd geen significante *lack-of fit* aangetoond voor de lineaire relatie. Uit deze analyse blijkt dat een lineair model de samenhang tussen de data het best beschrijft. Uit de Statgraphics analyse blijkt dat 95% betrouwbaarheidsintervallen van zowel de regressielijn als de lineaire relatie redelijk compact zijn (figuur 14, onder). Met het 95% betrouwbaarheidsinterval kan de waarde van een voorspelling met dit model worden beoordeeld. Bij een cyano-chlorofylgehalte van 70  $\mu\text{g/L}$  wordt bijvoorbeeld een biovolume van 19 voorspeld, met variaties tussen 15 en 24  $\text{mm}^3/\text{L}$  (23% afwijking). Met het cyano-chlorofyl kan dus een redelijk betrouwbare schatting worden gemaakt van het blauwalgen biovolume.

FIGUUR 14 HET VERBAND TUSSEN HET MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL EN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN BIOVOLUME VAN DE TOTALE DATASET, GELIMITEERD TOT MONSTERS MET EEN GEMETEN BIOVOLUME VAN MINDER DAN 40  $\text{MM}^3/\text{L}$ ; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 0,30 * X$ ;  $R^2 = 0,64$ . ONDER: STATGRAPHICS ANALYSE VAN DE 95% BETROUWBAARHEIDINTERVALLEN VAN DE REGRESSIELIJN (ROOD) EN DE VOORSPELDE DATA (PAARS)



De resultaten van de in de vorige paragrafen uitgevoerde analyses van de verschillende datasets (niet gelimiteerd) zijn samengevat in Tabel 2. In deze tabel zijn alle verhoudingen tussen de met fluorescentie bepaalde cyano-chlorofylgehalten en de microscopisch bepaalde parameters, blauwalgen celdichtheid en biovolume, op een rijtje gezet.

TABEL 2

VERHOUDINGEN TUSSEN MICROSCOPIE (CELDICHTHEID &amp; BIOVOLUME) EN FLUORESCENTIE

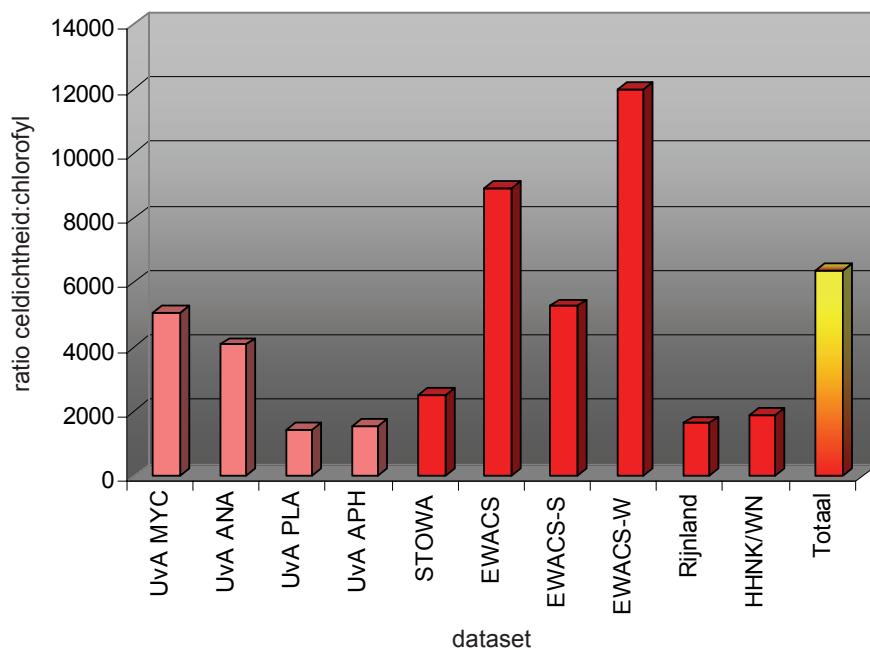
| dataset      | ratio celdichtheid:chlorofyl | ratio biovolume:chlorofyl | dominantie* |    |    |    |
|--------------|------------------------------|---------------------------|-------------|----|----|----|
| UvA MYC      | 5076                         | 0.118                     | MY          | 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

\*: MY = Microcystis; AN = Anabaena; PL = Planktothrix; AP = Aphanizomenon

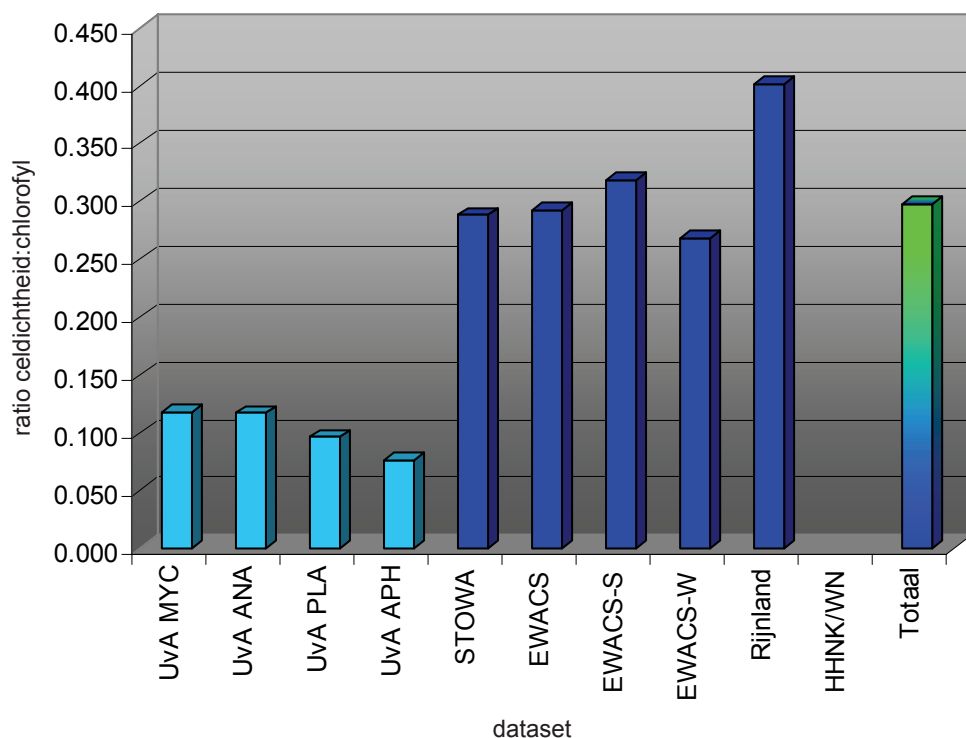
In Figuur 15 zijn de verhoudingen tussen blauwalgen celdichtheid en cyano-chlorofyl weergegeven. Er zijn grote verschillen te zien tussen de met verschillende datasets bepaalde verhoudingen, die variëren van 1.400 tot 12.000. De gemiddelde verhouding tussen celdichtheid en cyano-chlorofyl van de datasets van de in het veld bemonsterde blauwalgen is 5379, met een standaard deviatie van 79%. De grote spreidingen zijn te verklaren omdat naast de verschillen in chlorofyl concentraties ook de grootte van de cellen (soortverschillen en verschillen in ontwikkelingsstadium) invloed heeft op deze verhouding.

De verhoudingen tussen het blauwalgen biovolume en het cyano-chlorofylgehalte zijn weergegeven in Figuur 16. Er is een opmerkelijk verschil tussen de op het laboratorium van de UvA gekweekte cellen en de in het veld groeiende blauwalgen. Blijkbaar zijn de chlorofylgehalten van de cellen van de UvA kweken veel hoger dan die van de natuurlijke blauwalgen. De biovolume:chlorofyl verhoudingen van de gekweekte blauwalgen zijn overigens onvoldoende betrouwbaar omdat ze zijn berekend met een kleine dataset met een zeer hoge spreiding (Bijlage 3). De biovolume:chlorofyl verhoudingen van in het veld bemonsterde blauwalgen liggen echter wel dicht bij elkaar (van 0,29 tot 0,40). Met uitzondering van de met de Rijnland dataset bepaalde verhouding liggen de waarden zeer dicht bij de verhouding van 0,30 die met de totale dataset zonder extreem hoge algenconcentraties werd bepaald. De gemiddelde verhouding tussen biovolume en cyano-chlorofyl van de datasets van de in het veld bemonsterde blauwalgen is 0.314, met een standaard deviatie van 17%. Het blauwalgen biovolume lijkt dus goed te correleren met de fluorescentiemeting.

FIGUUR 15 DE VERHOUDINGEN TUSSEN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE CELDICHTHEID EN DE MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL CONCENTRATIE VOOR DE VERSCHILLENDE ONDERZOCHE DATASETS; ROZE = GEKWEekte BLAUWALGEN; ROOD = NATUURLIJKE BLAUWALGEN; ROOD-GEEL = TOTALE DATASET (GELIMITEERD)



FIGUUR 16 DE VERHOUDINGEN TUSSEN HET MICROSCOPISCH BEPAALDE BIOVOLUME EN DE MET FLUORESCENTIE BEPAALDE CYANO-CHLOROFYL CONCENTRATIE VOOR DE VERSCHILLENDE ONDERZOCHE DATASETS; LICHTBLAUW = GEKWEekte BLAUWALGEN; BLAUW = NATUURLIJKE BLAUWALGEN; BLAUW-GROEN = TOTALE DATASET (GELIMITEERD)

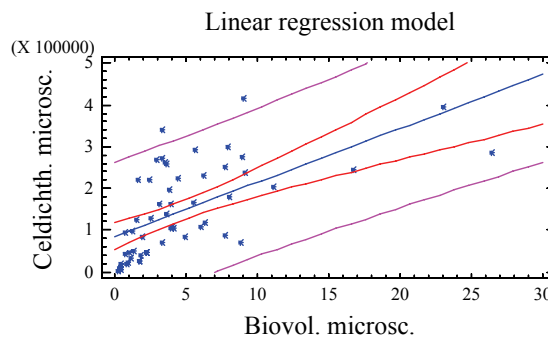
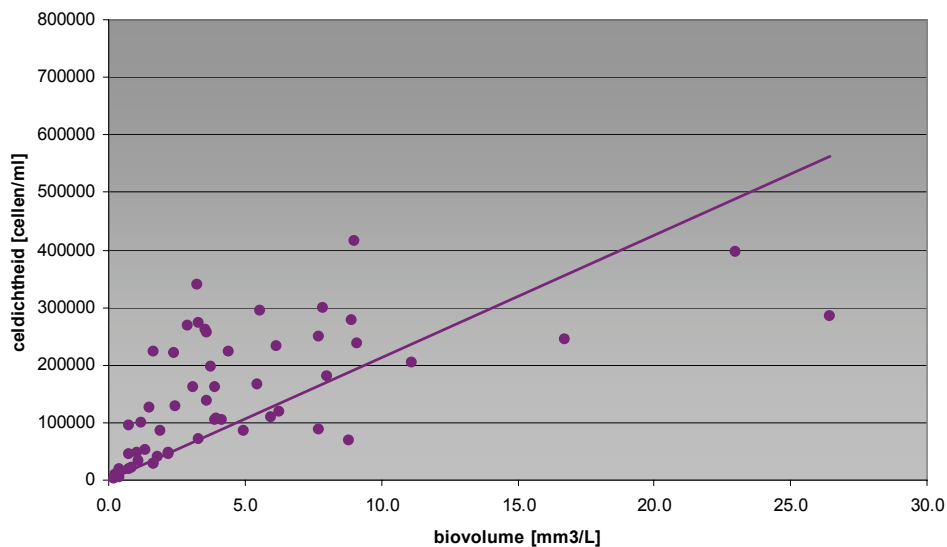


De relatie tussen celdichtheid en biovolume kan mogelijk worden gebruikt om de risiconormen voor blauwalgen op basis van celdichtheid om te zetten in normen op basis van biovolume. De samenhang tussen deze twee microscopisch bepaalde parameters wordt



geïllustreerd in figuur 17, voor de totale gelimiteerde dataset (55 waarnemingen). Met Statgraphics werd een lineaire correlatie gevonden met de vergelijking: celdichtheid = 85.537 + 12.905 \* biovolume. Er is een significant lineair verband aantoonbaar tussen de blauwalgen celdichtheid en het blauwalgen biovolume ( $p < 0,0001$ ). Met een kleinste kwadraten analyse werd bepaald dat 37% van de variatie in biovolume met de lineaire vergelijking wordt verklaard en dat er met een ANOVA analyse geen significante *lack-of fit* (ontbreken van een lineaire samenhang) wordt aangetoond voor de lineaire relatie. Uit de Statgraphics analyse blijkt dat een aantal meer complexe modellen (*double reciprocal*, *S-curve*, *multiplicative*) de samenhang tussen de data een stuk beter beschrijven, maar dat het lineaire model voldoet. Uit de Statgraphics analyse blijkt dat 95% betrouwbaarheidsintervallen van zowel de regressielijn als de lineaire relatie redelijk groot zijn (figuur 17, onder). Met het 95% betrouwbaarheidsinterval kan de waarde van een voorspelling met dit model worden beoordeeld. Bij een biovolume van 26,4 mm<sup>3</sup>/L wordt bijvoorbeeld een celdichtheid van 426.000 voorspeld, met variaties tussen 224.000 en 629.000 cellen/ml (48% afwijking). Met het biovolume kan dus alleen een ruwe schatting worden gemaakt van de blauwalgen celdichtheid, maar deze schatting zal niet erg betrouwbaar zijn. Door de relatief grote afwijking zal de conversie van de risiconormen niet erg nauwkeurig zijn.

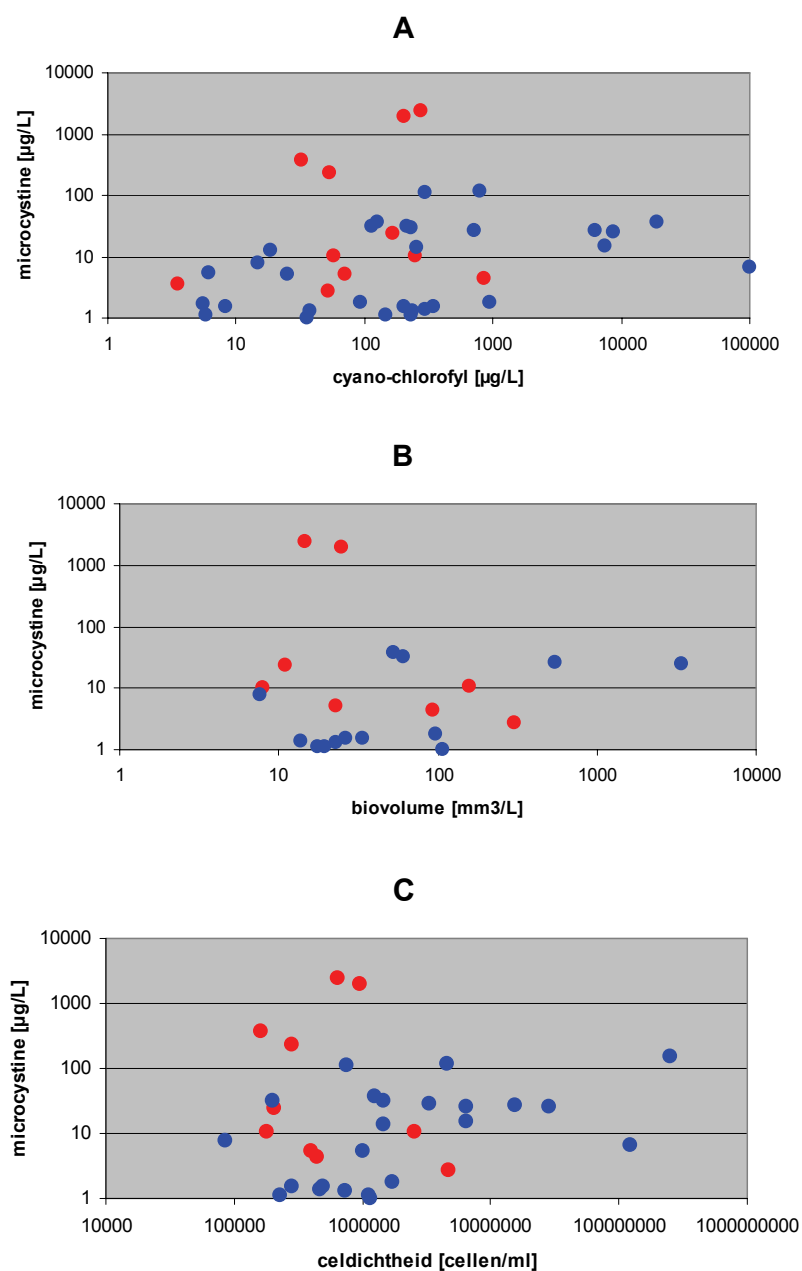
FIGUUR 17 HET VERBAND TUSSEN DE MICROSCOPISCH BEPAALDE BLAUWALGEN PARAMETERS BIOVOLUME EN CELDICHTHEID VAN DE TOTALE DATASET, GELIMITEERD TOT MONSTERS MET EEN GEMETEN CELDICHTHEID VAN MINDER DAN 1.000.000 CELLEN/ML EN/OF EEN BIOVOLUME VAN MINDER DAN 40 MM<sup>3</sup>/L; TRENDLIJN DOOR NUL:  $Y = 21300 * X$ ;  $R^2 = 0.03$ ; ONDER: STATGRAPHICS ANALYSE VAN DE 95% BETROUWBAARHEIDINTERVALLEN VAN DE REGRESSIELIJN (ROOD) EN DE VOORSPELDE DATA (PAARS)



### 3.3 RELATIES TUSSEN BLAUWALGEN AANWEZIGHEID EN MICROCYSTINE

Omdat de risico's van blauwalgen worden bepaald door de hoeveelheid geproduceerde gifstoffen is het belangrijk om na te gaan met welke van de onderzochte parameters (cyano-chlorofyl, celdichtheid en biovolume) een indicatie kan worden gegeven over de toxinegehalten in het zwemwater. In een beperkt aantal monsters zijn ook microcystinegehalten gemeten met de ELISA methode (Bijlagen 3 en 5). De relaties tussen de drie onderzochte parameters en de totaal microcystinegehalten zijn weergegeven in Figuur 18. Uit de grafieken blijkt dat zelfs op logaritmische schalen geen van de onderzochte parameters een lineaire relatie heeft met het totale microcystinegehalte (intra- en extracellulair). Ook als deze relaties worden onderzocht met alleen de monsters waarin *Microcystis* dominant is (rode punten in de grafieken) wordt er geen lineaire verband gevonden. De microcystine concentraties zijn dus niet goed te voorspellen met fluorescentie analyse of microscopisch onderzoek.

FIGUUR 18 RELATIES TUSSEN HET TOTAAL MICROCYSTINEGEHALTE EN A. CYANO-CHLOROFYL. B. BLAUWALGEN BIOVOLUME EN C. CELDICHTHEID BLAUWALGEN; WEERGAVE OP LOG-LOG SCHAAL; ROOD = LOCATIES MET MICROCYSTIS DOMINANTIE



# 4

## DISCUSSIE

### 4.1 BETROUWBAARHEID VAN DE FLUORESCENTIE ANALYSE

Voor het uitvoeren van een *in vivo* fluorescentieanalyse kunnen factoren zoals licht, temperatuur, waterkwaliteit en opgeloste componenten het resultaat beïnvloeden (Jacob et al., 2005). Deze factoren kunnen significante gevolgen hebben voor de fluorescentie, onafhankelijk van de chlorofylconcentratie. De temperatuur heeft een omgekeerde verhouding met fluorescentie. De *in vivo* chlorofyl fluorescentie reactie verandert met ongeveer 1,4% per °C. Licht kan een significante rol spelen op de fluorescentie in algencellen. Algencellen die zich op een laag lichtniveau bevinden kunnen zich optimaliseren voor het opnemen van licht door hun chloroplasten aan de buitenrand van de cel te duwen of door meer chlorofyl te produceren per cel. Beide reacties kunnen een verhoging van de fluorescentie veroorzaken bij een onveranderde algenbiomassa. Het opgelost organisch materiaal zoals het afbraakproduct van chlorofyl (faeofytine), chlorofyl a, chlorofyl b en troebelheid kunnen ook een verkeerde verhoging aangeven van chlorofyl in het fluorescentiesignaal. Elk van deze factoren kan gecontroleerd en gecorrigeerd worden. Het wordt aanbevolen om de monsters voor de fluorescentie analyse minimaal een half uur in het donker bij kamertemperatuur te bewaren.

In eerste instantie werd onderzocht of de fluorescentie analyse van het chlorofyl van blauwalgen voldoende robuust was. Met een verdunningsreeks werd bepaald dat de lineariteit van de analyse in het gehele meetbereik van de Fluoroprobe (0 tot 400 µg chlorofyl per liter) zeer goed was. Bij hogere chlorofylgehalten geeft de Fluoroprobe een foutmelding, zodat een verdund monster moet worden geanalyseerd. Ook de herhaalbaarheid van de fluorescentie analyse, bepaald met tien analyses van een standaard controlemonster op verschillende dagen, bleek goed te zijn. Op grond van deze twee tests kan worden gesteld dat de chlorofyl analyse van de Fluoroprobe voldoende robuust is. Dit biedt mogelijkheden om deze test in te zetten bij de blauwalgen monitoring.

Om de methode te kunnen vergelijken met fluorescentie apparatuur van andere merken moet een methode worden gevonden om de fluorescentie signalen te kalibreren. Hiervoor werden de met fluorescentie bepaalde totaal chlorofylgehalten vergeleken met de gehalten die spectrofotometrisch volgens NEN-6520 werden bepaald. Er werd een lineair verband tussen de NEN-chlorofyl en het Fluoroprobe-chlorofyl gevonden, waarbij het met NEN-6520 bepaalde chlorofyl gemiddeld 1,6 maal hoger was dan de met fluorescentie bepaalde gehalten. Uit statistisch onderzoek blijkt dat met de lineaire samenhang tussen Fluoroprobe-chlorofyl en NEN-chlorofyl zeer betrouwbaar het NEN-chlorofyl kan worden geschat (afwijking ±13%). De waarden van de fluorescentie chlorofyl meting kunnen verschillen met die van de NEN-6520 chlorofyl meting omdat de methoden op verschillende principes berusten. Het is niet duidelijk welke methode het juiste chlorofylgehalte geeft, maar omdat de NEN methode als standaard wordt gebruikt op de Nederlandse waterschapslaboratoria lijkt dit een goede manier om de fluorescentie teijken. Door het goede lineaire verband tussen de beide chlo-

rofyf metingen kan de fluorescentiemeting worden gekalibreerd met de spectrofotometrische NEN 6520 analyse. Dit wordt bevestigd in een studie van Gregor en Marsalek (2004). Op deze manier kunnen fluorescentie metingen van laboratoria met verschillende apparatuur worden vergeleken.

#### 4.2 KALIBRATIE VAN DE FLUOROPROBE VOOR CELDICHTHEID EN BIOVOLUME

Om de relaties tussen fluorescentie en microscopische analyses te analyseren werd in eerste aanleg onderzocht wat de verschillen waren tussen de meest voorkomende giftige geslachten in Nederland (*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* en *Aphanizomenon*). Hiervoor werden cellen van de blauwalgen kweek van de Universiteit van Amsterdam gebruikt. Hoewel de dataset van dit onderdeel zeer beperkt was en hoge variaties werden waargenomen leek het er op dat de soortverschillen meer invloed hadden op verhouding celdichtheid:chlorofyl dan op de verhouding biovolume:chlorofyl. Om de robuustheid van het microscopische onderzoek te toetsen werden er monsters van de gekweekte blauwalgen naar drie laboratoria gestuurd met een goede reputatie op dit gebied (Het Waterlaboratorium, Koeman & Bijkerk en Aqualab). De resultaten van deze laboratoria vertoonden, vooral bij *Microcystis* en *Anabaena*, grote onderlinge verschillen voor zowel celdichtheid (Tabel 1) als biovolume. De blauwalgen van de UvA kweken vormden geen kolonies, waardoor het goed materiaal was om de laboratoria onderling te vergelijken. Door de laboratoria die het microscopische onderzoek uitvoerden werd aangegeven dat de op de UvA gekweekte blauwalgen morfologisch afwijken van de 'normale' blauwalgen die in het Nederlandse oppervlaktewater worden aangetroffen. Dit is geen ongewoon verschijnsel bij gecultiveerde algen (Ronald Bijkerk, persoonlijke mededeling). De zeer grote onderlinge verschillen tussen de verschillende laboratoria is een indicatie dat het kwantitatieve microscopische onderzoek niet geschikt is voor een betrouwbare risicoanalyse van blauwalgen.

De relatie tussen de fluorescentie van cyano-chlorofyl en de microscopisch bepaalde hoeveelheid blauwalgen (celdichtheid en biovolume) is met verschillende datasets onderzocht. Het was echter lastig om de kwaliteit van de relaties tussen fluorescentie en microscopie te beoordelen omdat de robuustheid van het microscopische onderzoek onzeker was. De correlatie tussen de fluorescentie en de celdichtheid was slecht. Het met lineaire regressie bepaalde verband tussen de fluorescentie en de celdichtheid varieerde bovendien sterk voor datasets waarin verschillende blauwalgen geslachten dominant waren. Het is niet mogelijk om met de fluorescentiemeting het aantal blauwalg cellen te schatten omdat de verhouding celdichtheid:cyano-chlorofyl per locatie sterk kan verschillen. Uit het statistische onderzoek blijkt dat er wel een significante lineaire correlatie kan worden aangetoond maar dat de voorspellende waarde van deze relatie zeer onbetrouwbaar is. Dit lijkt logisch omdat het chlorofylgehalte onder andere afhankelijk is van de grootte van de blauwalgen cellen. De grootte van de cellen kan afhankelijk zijn van de algensoort en groeicondities van de blauwalgen. Zo kan het volume van de cellen van de geslachten *Microcystis* (circa  $\varnothing$  3,5  $\mu$ m) en *Anabaena* (circa  $\varnothing$  6  $\mu$ m) gemakkelijk een factor vijf verschillen. In een studie van Gregor et al. (2005) werden eveneens grote soortverschillen aangetoond voor de relatie tussen fluorescentie en celdichtheid..

Ondanks de onzekerheden van het microscopische onderzoek bleek de relatie tussen fluorescentie en het blauwalgen biovolume redelijk goed te zijn. Het met lineaire regressie bepaalde verband tussen de fluorescentie en het volume van de blauwalgen bleek bovendien redelijk constant te zijn voor datasets waarin verschillende blauwalgen geslachten dominant waren.

Er bleek echter wel een opmerkelijk verschil te bestaan tussen de biovolume:cyano-chlorofyl verhoudingen van op het laboratorium gekweekte blauwalgen en in het veld gevonden blauwalgen. Een oorzaak van dit verschil kan zijn dat gekweekte blauwalgen, naast de eerder genoemde morfologische afwijkingen, verhoogde chlorofyl concentraties in de cellen hebben. Dit zou mogelijk veroorzaakt kunnen zijn door de lagere intensiteit van het licht waarbij ze gekweekt zijn in vergelijking tot zonlicht. Daarnaast was het lastig om met de beperkte dataset van de gekweekte cellen een betrouwbare lineaire relatie aan te tonen, zodat de exacte verhouding tussen de cyano-chlorofylgehalten en het biovolume bij deze monsters moeilijk vast te stellen was. Alle waarden van de biovolume:chlorofyl verhouding van de individuele kweekmonsters liggen echter ruim onder de gemiddelde verhouding van 0,3 die in veldmonsters werd gevonden (verhouding na NEN-correctie is 0,2). Uit het statistische onderzoek van een gelimiteerde dataset van in het veld verzamelde monsters met biovolumina kleiner dan 40 mm<sup>3</sup>/L blijkt dat er een zeer significante lineaire correlatie tussen cyano-chlorofyl en blauwalgen biovolume bestaat. Omdat de verhouding biovolume:cyano-chlorofyl bij de natuurlijke blauwalgen redelijk constant is kan het volume van de blauwalgen goed worden geschat met een fluorescentiemeting. Op basis van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de gelimiteerde dataset kan een voorspelling van het biovolume met een nauwkeurigheid van ±23% worden gemaakt.

#### 4.3 RELATIES TUSSEN BLAUWALGEN AANWEZIGHEID EN MICROCYSTINE

Het grootste probleem van blauwalgen is dat deze organismen gifstoffen (cyanotoxines) kunnen produceren. Bij een bloei kan dit leiden tot gevaarlijk hoge toxinegehalten die een risico zijn voor de recreanten die tijdens het zwemmen water met blauwalgen binnen krijgen. Vaak zijn de verschijnselen van de cyanotoxines moeilijk te onderscheiden van andere oorzaken, maar milde klachten zoals huidirritatie, diarree en misselijkheid lijken tamelijk algemeen voor te komen bij zwemmers na contact met blauwalgen. Een epidemiologische studie met 852 recreanten laat een hoger aantal klachten over diarree, braken, koorts en irritaties aan ogen, oren en huid zien binnen een week na blootstelling aan blauwalgen. De gezondheidsklachten zijn gerelateerd aan de blootstellingduur en de dichtheid van de blauwalgen (Pilotto et al., 1997). In de datasets die voor het in dit rapport beschreven onderzoek zijn geanalyseerd bleek er geen relatie te bestaan tussen de gehalten aan microcystine (het meest gemeten cyanotoxine) en de met fluorescentie of microscopie verkregen parameters (cyano-chlorofyl, blauwalgen celdichtheid en biovolume). Ook als alleen de locaties in beschouwing werden genomen met een *Microcystis* dominantie werden geen lineaire correlaties waargenomen. Bij de microcystine analyse werden de totale gehalten bepaald in zowel water als blauwalgen cellen, terwijl met fluorescentie en microscopie alleen gegevens over de blauwalgen worden bepaald. In de praktijk blijkt echter dat gemiddeld 95% van de cyanotoxines in de cellen van de blauwalgen zitten. Er zijn echter uitzonderingen waarbij hogere gehalten in de waterfase voor kunnen komen. Veruit de belangrijkste oorzaak van het ontbreken van een lineair verband is echter dat lang niet alle stammen van de potentieel toxische soorten blauwalgen toxine produceren omdat veel soorten het gen voor de toxineproductie missen (Kardinaal, 2007). Daarnaast is er een grote variatie in de snelheid van toxine productie die bijvoorbeeld afhankelijk kan zijn van de groei van de cellen en het al dan niet tot expressie komen van het toxine gen. Door al deze factoren zal nooit een betrouwbare relatie tussen concentraties blauwalgen en toxines worden gevonden. Dit maakt het bijzonder lastig om de risico's van blauwalgen te schatten op grond van de concentraties blauwalgen. Als indicatie van de risico's op basis van concentraties blauwalgen wordt daarom een *worst-case* benadering gebruikt waarbij meestal een overschatting van het risico gemaakt wordt.

#### 4.4 TOEPASSING VAN FLUORESCENTIE BIJ DE BLAUWALGEN MONITORING

Het monitoren van de risico's van giftige blauwalgen is een complexe zaak. Omdat de verschillende soorten blauwalgen een zeer groot aantal verschillende gifstoffen kunnen produceren, waarvan de toxiciteit voor een groot deel nog onbekend is, kan niet worden volstaan met een eenvoudige chemische analyse. De risicoanalyse op grond van de in Nederland meest gemeten gifstof microcystine, die voorheen werd gehanteerd in het CIW protocol, lijkt onvoldoende betrouwbaar omdat hiermee alle andere gifstoffen worden genegeerd. Het feit dat er in Nederland steeds meer soorten blauwalgen worden waargenomen betekent dat ook het aantal mogelijke gifstoffen toeneemt. De werkgroep Cyanobacteriën heeft daarom in 2008 een nieuw protocol voorgesteld waarin de risicobeoordeling wordt gemaakt op grond van drijflagen of het aantal blauwalgen (cyano werkgroep, 2008). Deze beoordeling maakt gebruik van de door de Wereld Gezondheidsorganisatie WHO voorgestelde aantal blauwalgen cellen van 100.000 per ml (WHO, 1999), waarboven risico's voor de zwemmers kunnen worden verwacht. De WHO norm was gebaseerd op een *worst-case* benadering voor het aantal *Microcystis* cellen dat ongeveer 20 µg microcystine produceert. Bij deze benadering wordt uitgegaan van de aanname dat een *Microcystis* cel 0,2 pg microcystine bevat en dat het volume van een cel gemiddeld 60 µm<sup>3</sup> is (Hoogenboezem et al., 2004). Omdat de celgrootte van blauwalgen zeer variabel kan zijn is het microcystinegehalte bij 100.000 *Microcystis* cellen in de meeste gevallen veel lager dan 20 µg/L. Op grond van dit voortschrijdende inzicht heeft de cyano werkgroep besloten om een twee maal hogere norm (200.000 cellen/ml) vast te stellen voor een negatief zwemadvies op grond van de celdichtheid. Inmiddels is norm voor een negatief zwemadvies op grond van de celdichtheid verder verhoogd tot 300.000 cellen/ml. De WHO norm op basis van chlorofyl-a (bij dominantie van blauwalgen) is vastgesteld op 50 µg/L, hetgeen overeenkomt met de norm die is ontwikkeld in een vergelijkend blauwalgen onderzoek met fluorescentie analyses (Izydorczyk et al., 2009).

Uit de resultaten van celtellingen van verschillende laboratoria die onderling grote verschillen laten zien blijkt dat de celdichtheid moeilijk te kwantificeren is. Het is daarom zeer lastig is om hiermee een blauwalgen risicoanalyse uit te voeren. Omdat het logisch lijkt dat een grotere cel ook meer toxines bevat en massievere drijflagen kan vormen is het beter om de risico's met blauwalgen biomassa of biovolume te beoordelen. Het biovolume kan zowel microscopisch als met fluorescentietechnieken worden bepaald. Volgens het WHO protocol uit 1999 is het ook mogelijk om de risico's te beoordelen met chlorofyl a gehalten, mits giftige blauwalgen dominant zijn. Met de nieuwe fluorescentietechnieken kan het chlorofyl van de blauwalgen specifiek worden bepaald, ook als deze niet dominant aanwezig zijn. Bij de cyano-chlorofyl analyse moet echter wel een microscopische analyse worden uitgevoerd om te bepalen of de giftige soorten dominant zijn. Dit lijkt dus een goed alternatief voor de arbeidsintensieve celtelling. Op grond van door de WHO voorgestelde norm van 50 µg/L kan met de relatie tussen cyano-chlorofyl en biovolume een norm voor het blauwalgen biovolume van 10 mm<sup>3</sup>/L worden afgeleid. In Tabel 3 is een overzicht gegeven van de normen die mogelijk kunnen worden gehanteerd voor maatregelen om risico's van blauwalgen te voorkomen. In veel gevallen zal een visuele inspectie van de drijflagen (met microscopische bevestiging) echter al voldoende zijn voor de risicoanalyse.

TABEL 3

| BLAUWALGEN NORMEN                     |                      |                           |                                 |                         |
|---------------------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Normen                                | microcystine<br>µg/L | celdichtheid<br>cellen/ml | biovolume<br>mm <sup>3</sup> /L | cyano-chlorofyl<br>µg/L |
| <b>Norm 1:</b> Verhoogde waakzaamheid | -                    | 20.000                    | 1                               | 5                       |
| <b>Norm 2:</b> Waarschuwing           | 10*                  | 100.000**                 | 5                               | 25                      |
| <b>Norm 3:</b> Negatief zwemadvies    | 20*                  | 200.000***                | 10                              | 50**                    |

\*: CIW norm

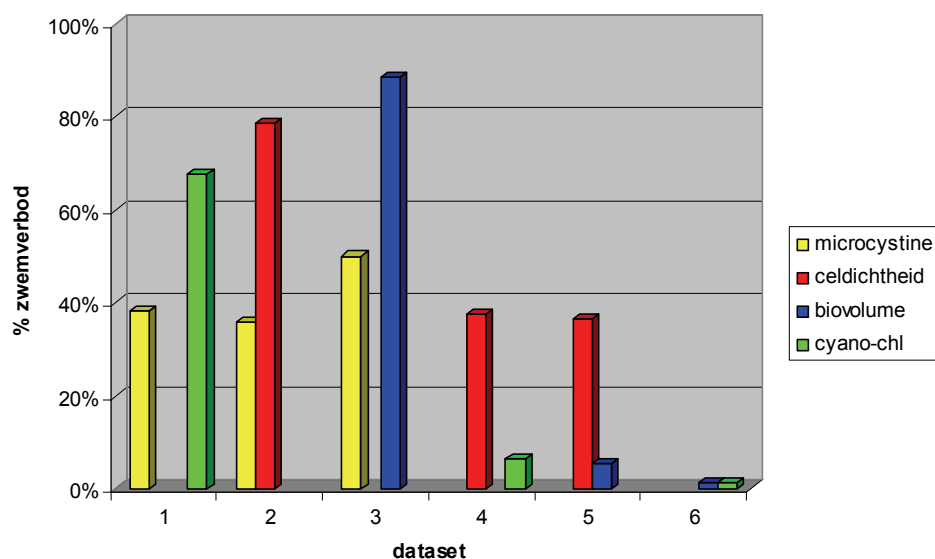
\*\*: WHO normen voor hoog risico

\*\*\*: WHO norm celdichtheid hoog risico, aangepast door de werkgroep cyanobacteriën

In figuur 19 is weergegeven hoe het percentage zwemverboden zou zijn als we 6 datasets vergelijken waarbij telkens 2 verschillende normen worden gehanteerd. De volgende bestaande en afgeleide normen zijn in deze analyse met elkaar vergeleken: Microcystine > 20 µg/L, Celdichtheid > 200.000 cellen/ml, Biovolume > 10 mm<sup>3</sup>/L en Cyano-chlorofyl > 50 µg/L.

FIGUUR 19

VERGELIJKING DE PERCENTAGES ZWEMVERBODEN VAN ZES DATASETS DIE ZOUDE WORDEN AFGEVAARDIGD OP GROND VAN VIER VERSCHILLENDE NORMEN: MICROCYSTINE: > 20 µg/L; CELDICHTHEID: > 200.000 CELLEN/ML; BIOVOLUME: > 10 MM<sup>3</sup>/L; CYANO-CHLOROFYL: > 50 µg/L



In de eerste drie datasets (1. microcystine vs. cyano-chl, 2. microcystine vs. celdichtheid en 3. microcystine vs. biovolume) is de oude microcystine norm vergeleken met de normen op grond van blauwalgen concentraties. In alle gevallen zal het aantal zwemverboden toenemen ten opzichte van de microcystine norm, voornamelijk omdat er op de locaties waar deze norm niet wordt overschreden andere soorten blauwalgen dan *Microcystis* dominant zijn. Daar komt nog eens bij dat niet alle stammen van *Microcystis* toxine produceren. Omdat bij de datasets waarin microcystine analyses zijn uitgevoerd altijd hoge blauwalgen gehalten werden waargenomen is het percentage zwemverboden bij deze drie datasets veel hoger dan bij de overige datasets. In deze drie datasets (4. celdichtheid vs. cyano-chl, 5. celdichtheid vs. biovolume en 6. biovolume vs. cyano-chl) werden meer reguliere monsters geanalyseerd zonder directe blauwalgen problemen. Bij deze datasets is het opvallend dat het percentage zwemverboden op grond van de celdichtheid veel groter is dan op grond van het microscopisch bepaalde biovolume en het cyano chlorofylgehalte. Dit kan veroorzaakt worden door onnauwkeu-

righeden van de tellingen of doordat er relatief veel kleine cellen in de monsters aanwezig zijn. Het feit dat er op grond van het (eveneens microscopisch bepaalde) biovolume veel minder overschrijdingen van de norm zijn lijkt een indicatie dat er op grond van de norm voor celdichtheid zwemverboden worden afgegeven bij lage risico's. Dit kan echter pas objectief worden beoordeeld als er meer informatie over de concentraties van alle mogelijke cyanotoxines beschikbaar is.

Als we de verschillende normoverschrijdingen vergelijken met de microcystinegehalten zien we dat er 1 monster is waarbij de norm voor celdichtheid en cyano-chlorofyl niet wordt overschreden, maar waarin wel een zeer hoog microcystinegehalte (366 µg/L) werd waargenomen. In dit monster werd geen biovolume bepaald. Het is mogelijk dat er op deze locatie op het moment van de bemonstering een hoge concentratie extracellulair microcystine aanwezig was. Als de norm voor de celdichtheid zou worden verhoogd naar 300.000 cellen/ml zouden er vier locaties met wel een normoverschrijding voor microcystine, maar geen overschrijding van deze alternatieve norm voor celdichtheid. Omdat hieruit blijkt dat het verhogen van de norm voor celdichtheid kan leiden tot meer onderschattingen van de risico's lijkt dit geen goede optie.

Concluderend kan worden gezegd dat gebruik van *in situ /in vivo* chlorofyl-*a* fluorescentie een zeer bruikbaar hulpmiddel lijkt voor de waterbeheerder om snel en betrouwbaar een indruk te krijgen van de hoeveelheid fytoplankton en het aandeel cyanobacteriën in een water (Lurling, 2007). Op dit moment is er echter nog geen snelle, simpele en betrouwbare monitoring methode beschikbaar om de werkelijke risico's van blauwalgen te bepalen. De oude CIW norm op basis van het toxische microcystine voldoet niet omdat hiermee niet de risico's van andere toxines worden geanalyseerd. De normen op basis van de concentraties blauwalgen (celdichtheid, biovolume en cyano-chlorofyl) hebben de beperking dat het extracellulaire toxine niet bij de beoordeling wordt meegenomen. De norm op basis van celdichtheid heeft bovendien het bezwaar dat er waarschijnlijk veel overschrijdingen van de norm zijn terwijl de risico's voor de zwemmers verwaarloosbaar zijn. Op dit moment lijkt daarom een normering op basis van biovolume of cyano-chlorofyl het meest relevant. In de toekomst zal een meer betrouwbare monitoring methode moeten worden ontwikkeld, die gebaseerd is op de effecten van de cyanotoxines op cellen (cytotoxiciteit), lever (levertoxiciteit) en het zenuwstelsel (neurotoxiciteit). In principe kan deze effectgerichte risicoanalyse worden uitgevoerd met twee bioassays (biologische toetsen) omdat het toxische effect op cellen met dezelfde tests kan worden meegenomen. Omdat andere stoffen dezelfde effecten kunnen sorteren kan niet altijd met zekerheid worden gesteld dat blauwalgen de bron van de gemeten toxiciteit zijn. Het effect van het totale mengsel van in het water aanwezige gifstoffen is echter wel het meest relevant om de risico's voor de zwemmers te analyseren.

Het Nationaal Water Overleg (NWO) heeft in maart 2010 een nieuw blauwalgenprotocol vastgesteld, waarin een aantal aanbevelingen (uit de conceptversie van) dit rapport al opgenomen zijn. Daarbij is er een keuzemogelijkheid om de blauwalgen risico's te analyseren aan de hand van celdichtheid, biovolume of cyano-chlorofyl. De risicoanalyse is gebaseerd op de richtwaarden in de onderstaande tabel. Ervaring leert dat zelfs een biovolume bepaling op basis van vaste volume-per-cel waarden voor de verschillende blauwalgen geslachten relevanter is dat de beoordeling op basis van celdichtheid (Arco Wagenvoort, persoonlijke mededeling).



TABEL 4 BLAUWALGEN NORMEN VOLGENS HET NWO PROTOCOL 2010

| Normen & acties  | drijfslag    | celdichtheid<br>cellen/ml | biovolume<br>mm <sup>3</sup> /L | cyano-chlorofyl<br>µg/L |
|--|--------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 1. Verhoogde alertheid (wekelijks monitoren, microscopisch onderzoek toxische soorten) | categorie 1* | -                         | -                               | -                       |
| 2: Waarschuwing plaatsen   | categorie 2  | 50.000                    | 2.5                             | 12.5                    |
| 3: Negatief zwemadvies afgeven (extreme gevallen zwemverbod)                           | categorie 3  | 300.000                   | 15                              | 75                      |

\*: Als er geen dagelijkse inspectie van de zwemlocatie plaatsvindt moet er ook bij een categorie 1 drijfslag een waarschuwing worden afgegeven.

# 5

## CONCLUSIES & AANBEVELINGEN

### 5.1 CONCLUSIES

- Op grond van proeven met de lineariteit en reproduceerbaarheid kan worden geconcludeerd dat de betrouwbaarheid van de fluorescentie analyse met de bbe Moldaenke Fluoroprobe goed is binnen het meetbereik van 0 tot 400 µg chlorofyl per liter.
- Er is een sterk significante lineaire relatie tussen het met fluorescentie bepaalde totaalchlorofyl en het spectrofotometrisch bepaalde chlorofyl volgens NEN-6520. De verhouding tussen deze twee chlorofylgehalten is 1,6. Door de kalibratie aan te passen kan hiervoor direct in de Fluoroprobe worden gecorrigeerd. IJking met NEN-chlorofyl lijkt een goede basis om resultaten van verschillende laboratoria met verschillende fluorescentie apparatuur te vergelijken.
- Er bestaat een zwak significante relatie tussen het met fluorescentie bepaalde cyano-chlorofyl en de microscopisch bepaalde blauwalgen celdichtheid. De samenhang tussen deze parameters is echter onvoldoende om een betrouwbare voorspelling van de blauwalgen celdichtheid te doen op grond van het cyano-chlorofylgehalte.
- Er is een sterk significante lineaire correlatie tussen het met fluorescentie bepaalde cyano-chlorofyl en het microscopisch bepaalde blauwalgen biovolume. Dit biedt een goede basis om een betrouwbare voorspelling van het blauwalgen biovolume te doen op grond van het cyano-chlorofylgehalte.
- Voor geen van de onderzochte blauwalgen parameters (cyano-chlorofyl, celdichtheid, biovolume) kon een duidelijk verband met de totaal microcystinegehalten worden aangetoond. Ook als alleen de locaties met Microcystis dominantie in beschouwing werden genomen werden geen relaties aangetoond. De belangrijkste oorzaak van het ontbreken van een lineair verband is dat niet alle stammen van de potentieel toxische blauwalgen toxines produceren en dat de toxineproductie van veel factoren af kan hangen. Extracellulaire toxines worden met deze analyses genegeerd.
- De fluorescentiemethode is goed toepasbaar bij de monitoring van zwemwateren op blauwalgen. De methode levert een betrouwbare, kwantitatieve maat voor de hoeveelheid blauwalgen, die vergelijkbaar is met een microscopische analyse van het biovolume.
- Met de fluorescentiemethode wordt geen informatie verkregen over de soort blauwalgen in het systeem. Voor een risicoanalyse van blauwalgen zal de methode daarom altijd in combinatie met een analyse van de soortensamenstelling toegepast moeten worden.

### 5.2 AANBEVELINGEN

Op basis van de uitkomsten van deze studie beveelt de Werkgroep Cyanobacteriën aan:

- De fluorescentiemeting in een norm te verwerken, waarbij de ISO-guideline voor sensoren (ISO/DIS 15839) als leidraad wordt gehanteerd.
- De normen voor risico's van blauwalgen van het blauwalgenprotocol 2008 aan te passen: de risicoanalyse niet uitvoeren op basis van blauwalgen celdichtheid, maar normen vaststellen op basis van biovolume of cyano-chlorofyl. Bij toepassing van fluorescentie moet

altijd een kwalitatief microscopisch onderzoek worden uitgevoerd om de dominante soorten blauwalgen te bepalen

- Vanaf 2010 alternatieve normen & acties te gebruiken om de blauwalgenrisico's te monitoren:
  - cyano-chl > 5 µg/L of cyano-biovolume > 1 mm<sup>3</sup>/L.: verhogen monitoring frequentie.
  - cyano-chl > 25 µg/L of cyano-biovolume > 5 mm<sup>3</sup>/L, giftige blauwalgen: waarschuwing
  - cyano-chl > 50 µg/L cyano-biovolume > 10 mm<sup>3</sup>/L, giftige blauwalgen: negatief zwemadvies
- Een ringonderzoek uit te voeren waarbij de fluorescentiemethoden en de microscopische analyses van de verschillende Nederlandse laboratoria worden vergeleken. In de voor dit ringonderzoek aangeboden monsters toxineanalyses uit te voeren om de relevantie van de uitkomsten te kunnen toetsen. Naar aanleiding van de resultaten van deze studie de normen voor risico's van blauwalgen van het blauwalgenprotocol 2010 aan te passen.
- Onderzoek naar de ontwikkeling van een effectgericht monitoring systeem met bioassays om de effecten van cyanotoxines op de lever, het zenuwstelsel en cellen te analyseren. Hiermee zal in de toekomst een nieuw systeem voor risicoanalyse van blauwalgen moeten worden ontwikkeld, dat gebaseerd is op de effecten van alle aanwezige cyanotoxines.

# 6

## LITERATUUR

- Beutler M, Wiltshire KH, Meyer B, Moldaenke C, Lüring C, Meyerhöfer M, Hansen UP, Dau H, 2002. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynth Res.* 72: 39-53.
- CIW, 2002. Veilig zwemmen; Cyanobacteriën in zwemwater. Aangepast protocol Commissie Integraal Waterbeheer.
- Cyano werkgroep, 2008. Blauwalgenprotocol. STOWA notitie werkgroep Cyanobacteriën.
- Gregor J & Marsalek B, 2004. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research* 38: 517-522.
- Gregor J, Geris R, Marsalek B, Hetesa J & Marvan P, 2005. In situ quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer *Hydrobiologia* 548:141-151.
- Hoogenboezem W, Wagenvoort AJ en Blaauwboer K, 2004. The occurrence of toxic cyanobacteria in some Dutch surface waters used for the production of drinking water. RIWA report Rhine Waterworks, Netherlands.
- Izydorczyk K, Carpentier C, Mrowczynski J, Wagenvoort A, Jurczak T, Tarczynskad M, 2009. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a. *Water Research* 43: 989-996.
- Jakob T, Schreiber U, Kirchesch V, Langner U, Wilhelm C, 2005. Estimation of chlorophyll content and daily primary production of the major algal groups by means of multiwavelength-excitation PAM chlorophyll fluorometry: performance and methodological limits. *Photosynth Res.* 83: 343-61.
- Leboulanger C, Dorigo U, Jacquet S, Le Berre B, Paolini G en Humbert J-C, 2002. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms : a case study. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 30: 83-89.
- Lurling, M, 2007. Bepaling van chlorofyl-a en de hoeveelheid blauwalg (cyanobacteriën) met behulp van in vivo fluorescentie, Notitie Universiteit van Wageningen.
- NEN, 2006. Water – Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a. NEN-norm 6520:2006
- Pilotto LS, Douglas RM, Burch MD, Cameron S, Beers M, Rouch GR, Robinson F, Kirk M, Cowie CT, Moore C & Attewell RG, 1997. Health effects of recreational exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. New Zeal. J. Public Health* 21: 562-566.
- Schaub, B, 2007. Gebruik en aanschaf van de Fluoroprobe binnen het Fytoplanktononderzoek van Rijnland, Schieland en de Krimpenerwaard, Adviesnotitie HH Rijnland
- WHO, 1999. Chorus en Bertram, WHO Guidelines for safe recreational water environments Volume 1 : Coastal and fresh waters,



# BIJLAGEN

## TOEPASSING VAN FLUORESCENTIE BIJ DE BEOORDELING VAN DE RISICO'S VAN GIFTIGE BLAUWALGEN

## BIJLAGE 1

| Resultaten blauwalgen onderzoek Rijnland |            |        |                    |                        |                     |                   |                      |
|--|------------|--------|--------------------|------------------------|---------------------|-------------------|----------------------|
| Monsterpunt                              | Datum      | Diepte | CHL-cyano<br>Probe | Biovolume<br>Microscop | CHL-totaal<br>Probe | CHL-totaal<br>NEN | Dominante soort(en)* |
|  |            | m      | µg/L               | mm3/L                  | µg/L                | µg/L              |                      |
| <b>2008</b>                              |            |        |                    |                        |                     |                   |                      |
| R0298                                    | 04-07-2008 | 2      | 2.91               | 4.98                   | 9.96                | 26                | MYC                  |
| R0298                                    | 04-07-2008 | 8      | 0.86               | 1.24                   | 1.02                | <4                | MYC PLA              |
| R0298                                    | 10-07-2008 | 2      | 5.3                | 0.77                   | 7.99                | 16                | MYC                  |
| R0298                                    | 10-07-2008 | 8      | 0.52               | 0.42                   | 1.18                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 17-07-2008 | 2      | 9.23               | 2.82                   | 13.9                | 58                | MYC                  |
| R0298                                    | 17-07-2008 | 8      | 1.61               | 0.54                   | 3.27                |                   | MYC PLA              |
| R0298                                    | 24-07-2008 | 2      | 7.01               | 2.26                   | 10                  | 27                | MYC                  |
| R0298                                    | 24-07-2008 | 8      | 4.44               | 1.01                   | 5.76                |                   | MYC                  |
| R0298                                    | 31-07-2008 | 2      | 9.14               | 1.39                   | 19.4                | 84                | MYC                  |
| R0298                                    | 31-07-2008 | 8      | 2.3                | 0.48                   | 3.31                | 30                | MYC                  |
| R0298                                    | 08-08-2008 | 2      | 16.1               | 4.8                    | 19.6                | 49                | MYC                  |
| R0298                                    | 08-08-2008 | 8      | 3.74               | 0.53                   | 4.06                | 5.9               | MYC                  |
| R0298                                    | 14-08-2008 | 2      | 2.4                | 2.51                   | 2.82                | 8.1               | MYC PLA              |
| R0298                                    | 14-08-2008 | 8      | 2.04               | 1.54                   | 2.24                | 7.4               | MYC PLA              |
| R0298                                    | 22-08-2008 | 2      | 0.92               | 0.03                   | 1.15                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 22-08-2008 | 8      | 0.8                | 0.5                    | 1.22                | <4                | MYC PLA              |
| R0298                                    | 28-08-2008 | 2      | 0.57               | 0.03                   | 0.95                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 28-08-2008 | 8      | 0.55               | 0.08                   | 1.03                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 04-09-2008 | 2      | 1.04               | 0.6                    | 1.76                | 4.4               | MYC                  |
| R0298                                    | 04-09-2008 | 8      | 0.77               | 0.41                   | 1.47                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 11-09-2008 | 2      | 0.85               | 0.46                   | 1.88                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 11-09-2008 | 8      | 0.6                | 0.71                   | 1.22                | <4                | MYC PLA              |
| R0298                                    | 18-09-2008 | 2      | 0.37               | 2.76                   | 1.07                | <4                | MYC PLA              |
| R0298                                    | 18-09-2008 | 8      | 0.4                | 0.71                   | 0.78                | <4                | MYC PLA              |
| R0298                                    | 25-09-2008 | 2      | 0.4                | 0.11                   | 1.07                | <4                | MYC                  |
| R0298                                    | 25-09-2008 | 8      | 0.6                | 0.34                   | 1.11                | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 04-07-2008 | 2      | 2.03               | 3.37                   | 8.26                | 25                | MYC                  |
| R0299                                    | 04-07-2008 | 8      | 0.42               | 0.36                   | 0.58                | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 10-07-2008 | 2      | 2.54               | 1.79                   | 4.77                | 16                | MYC                  |
| R0299                                    | 10-07-2008 | 8      | 0.52               | 0.71                   | 0.91                | 4.4               | MYC                  |
| R0299                                    | 17-07-2008 | 2      | 3.53               | 5.43                   | 10.4                | 30                | MYC                  |
| R0299                                    | 17-07-2008 | 8      | 1.05               | 0.36                   | 4.01                | 8.9               | MYC                  |
| R0299                                    | 24-07-2008 | 2      | 4.42               | 1.06                   | 8.62                | 33                | MYC                  |
| R0299                                    | 24-07-2008 | 8      | 0.53               | 0.17                   | 0.79                | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 31-07-2008 | 2      | 11.8               | 10.74                  | 21.6                | 55                | MYC                  |
| R0299                                    | 31-07-2008 | 8      | 1.58               | 0.61                   | 2.09                | 5.9               | MYC                  |
| R0299                                    | 08-08-2008 | 2      | 5.2                | 3.79                   | 6.84                | 11                | MYC                  |
| R0299                                    | 08-08-2008 | 8      | 0.61               | 0.3                    | 0.63                | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 14-08-2008 | 2      | 2.55               | 0.86                   | 2.91                | 33                | MYC                  |
| R0299                                    | 14-08-2008 | 8      | 2.24               | 5.56                   | 2.66                | 5.9               | MYC                  |
| R0299                                    | 22-08-2008 | 2      | 1.11               | 0.21                   | 1.88                | 4.4               | MYC                  |
| R0299                                    | 22-08-2008 | 8      | 0.89               | 1.18                   | 1.2                 | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 28-08-2008 | 2      | 0.71               | 0.54                   | 1.23                | <4                | MYC                  |
| R0299                                    | 28-08-2008 | 8      | 0.49               | 0.21                   | 0.78                | <4                | MYC                  |

|       |            |   |      |      |      |     |     |     |     |
|-------|------------|---|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| R0299 | 04-09-2008 | 2 | 0.75 | 0.24 | 1.31 | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 04-09-2008 | 8 | 0.51 | 0.14 | 1.19 | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 11-09-2008 | 2 | 0.86 | 0.19 | 2.3  | 7.4 | MYC |     |     |
| R0299 | 11-09-2008 | 8 | 0.55 | 0.02 | 1.1  | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 18-09-2008 | 2 | 0.37 | 0.11 | 1.05 | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 18-09-2008 | 8 | 0.38 | 0.02 | 0.87 | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 25-09-2008 | 2 | 0.38 | 0.08 | 1.25 | <4  | MYC |     |     |
| R0299 | 25-09-2008 | 8 | 0.53 | 3.1  | 1.35 |     | MYC | PLA |     |
| R0897 | 04-07-2008 | 8 | 0.65 | 1.22 | 1.4  | 5.2 | MYC |     |     |
| R0897 | 10-07-2008 | 2 | 1.19 | 7.81 | 3.01 | 11  | MYC |     |     |
| R0897 | 10-07-2008 | 8 | 0.8  | 1.55 | 1.52 | 6.7 | MYC |     |     |
| R0897 | 17-07-2008 | 2 | 2.44 | 2.55 | 7.23 | 19  | MYC |     |     |
| R0897 | 17-07-2008 | 8 | 0.62 | 2.55 | 1.47 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 24-07-2008 | 2 | 3.91 | 1.78 | 11.6 | 30  | MYC |     |     |
| R0897 | 24-07-2008 | 8 | 0.51 | 8.02 | 0.82 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 31-07-2008 | 2 | 6.68 | 4.65 | 13.5 | 84  | MYC | PLA |     |
| R0897 | 31-07-2008 | 8 | 0.69 | 1.37 | 0.8  | 4.4 | MYC | PLA |     |
| R0897 | 08-08-2008 | 2 | 3.46 | 0.86 | 5.05 | 7.4 | MYC |     |     |
| R0897 | 08-08-2008 | 8 | 0.24 | 0.15 | 0.27 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 14-08-2008 | 2 | 2.07 | 0.45 | 2.85 | 5.9 | MYC |     |     |
| R0897 | 14-08-2008 | 8 | 0.89 | 1.08 | 1.24 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 22-08-2008 | 2 | 0.72 | 0.12 | 1.49 | 5.2 | MYC |     |     |
| R0897 | 22-08-2008 | 8 | 1.2  | 0.96 | 2.3  | 5.9 | MYC |     |     |
| R0897 | 28-08-2008 | 2 | 0.73 | 0.01 | 1.96 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 28-08-2008 | 8 | 0.67 | 0.02 | 1.64 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 04-09-2008 | 2 | 0.59 | 0.03 | 1.38 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 04-09-2008 | 8 | 0.62 | 0.03 | 1.24 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 11-09-2008 | 2 | 0.75 | 0.38 | 2.77 | 5.9 | MYC | PLA |     |
| R0897 | 11-09-2008 | 8 | 0.48 | 0.01 | 0.83 | <4  | MYC |     |     |
| R0897 | 18-09-2008 | 2 | 0.87 | 0.36 | 2.05 | 4.4 | MYC | PLA |     |
| R0897 | 18-09-2008 | 8 | 1.13 | 1.14 | 2.03 | 4.4 | MYC |     | APH |
| R0897 | 25-09-2008 | 2 | 0.91 | 0.12 | 2.13 | 6.7 | MYC |     | APH |
| R0897 | 25-09-2008 | 8 | 1.01 | 0.6  | 2.32 | 5.2 | MYC | PLA | APH |
| 2007  |            |   |      |      |      |     |     |     |     |
| R0281 | 17-07-2007 |   | 12.4 | 11.4 |      |     |     |     |     |
| R0281 | 31-07-2007 |   | 20.4 | 5.6  |      |     |     |     |     |
| R0281 | 14-08-2007 |   | 15.4 | 4.0  |      |     |     |     |     |
| R0281 | 28-08-2007 |   | 9.1  | 2.7  |      |     |     |     |     |
| R0281 | 12-09-2007 |   | 10.1 | 2.5  |      |     |     |     |     |
| R0284 | 17-07-2007 |   | 9.78 | 2.9  |      |     |     |     |     |
| R0284 | 31-07-2007 |   | 13.9 | 7.0  |      |     |     |     |     |
| R0284 | 14-08-2007 |   | 19.9 | 4.3  |      |     |     |     |     |
| R0284 | 28-08-2007 |   | 11.4 | 4.2  |      |     |     |     |     |
| R0284 | 12-09-2007 |   | 14.7 | 3.6  |      |     |     |     |     |
| R0865 | 17-07-2007 |   | 10   | 5.3  |      |     |     |     |     |
| R0865 | 31-07-2007 |   | 10.4 | 4.0  |      |     |     |     |     |
| R0865 | 14-08-2007 |   | 22.9 | 11.7 |      |     |     |     |     |
| R0865 | 28-08-2007 |   | 11.5 | 3.7  |      |     |     |     |     |
| R0865 | 12-09-2007 |   | 8.61 | 1.9  |      |     |     |     |     |

Codes: R0298, R0299 en R0897 = Vlietland;

\*: MYC = Microcystis (geel); PLA = Planktothrix (groen); ANA = Anabaena (blauw) en APH = Aphanizomenon (rood)



## BIJLAGE 2

| Resultaten chlorofyl analyses Waternet (Terra Nova) 2008 |            |                             |                           |             |            |                             |                           |
|--|------------|-----------------------------|---------------------------|-------------|------------|-----------------------------|---------------------------|
| opmerking  | datum      | CHL-totaal<br>Probe<br>µg/L | CHL-totaal<br>NEN<br>µg/L | opmerking   | datum      | CHL-totaal<br>Probe<br>µg/L | CHL-totaal<br>NEN<br>µg/L |
| 0 cm diep  | 30-06-2008 | 127                         | 230                       | 0 cm diep   | 13-08-2008 | 169                         | 201                       |
| 30 cm diep   | 30-06-2008 | 124                         | 210                       | 30 cm diep  | 13-08-2008 | 169                         | 245                       |
| 60 cm diep   | 30-06-2008 | 117                         | 229                       | 60 cm diep  | 13-08-2008 | 168                         | 242                       |
| 90 cm diep   | 30-06-2008 | 125                         | 246                       | 90 cm diep  | 13-08-2008 | 169                         | 242                       |
| 120 cm diep  | 30-06-2008 | 104                         | 203                       | 120 cm diep | 13-08-2008 | 169                         | 247                       |
| 150 cm diep  | 30-06-2008 | 78                          | 187                       | 150 cm diep | 13-08-2008 | 169                         | 234                       |
| 0 cm diep  | 09-07-2008 | 178                         | 346                       | 0 cm diep   | 15-08-2008 | 144                         | 157                       |
| 30 cm diep   | 09-07-2008 | 176                         | 339                       | 30 cm diep  | 15-08-2008 | 146                         | 198                       |
| 60 cm diep   | 09-07-2008 | 184                         | 344                       | 60 cm diep  | 15-08-2008 | 146                         | 201                       |
| 90 cm diep   | 09-07-2008 | 184                         | 352                       | 90 cm diep  | 15-08-2008 | 144                         | 207                       |
| 120 cm diep  | 09-07-2008 | 182                         | 338                       | 120 cm diep | 15-08-2008 | 144                         | 205                       |
| 150 cm diep  | 09-07-2008 | 465*                        | 184*                      | 150 cm diep | 15-08-2008 | 591*                        | 142*                      |
| 0 cm diep  | 15-07-2008 | 208                         | 416                       | 0 cm diep   | 21-08-2008 | 128                         | 189                       |
| 30 cm diep   | 15-07-2008 | 214                         | 384                       | 30 cm diep  | 21-08-2008 | 129                         | 182                       |
| 60 cm diep   | 15-07-2008 | 213                         | 411                       | 60 cm diep  | 21-08-2008 | 128                         | 188                       |
| 90 cm diep   | 15-07-2008 | 217                         | 381                       | 90 cm diep  | 21-08-2008 | 129                         | 178                       |
| 120 cm diep  | 15-07-2008 | 218                         | 373                       | 120 cm diep | 21-08-2008 | 126                         | 183                       |
| 150 cm diep  | 15-07-2008 | 211                         | 401                       | 150 cm diep | 21-08-2008 | 127                         | 189                       |
| 0 cm diep  | 22-07-2008 | 251                         | 473                       | 0 cm diep   | 29-08-2008 | 129                         | 215                       |
| 30 cm diep   | 22-07-2008 | 256                         | 450                       | 30 cm diep  | 29-08-2008 | 129                         | 165                       |
| 60 cm diep   | 22-07-2008 | 258                         | 414                       | 60 cm diep  | 29-08-2008 | 130                         | 325                       |
| 90 cm diep   | 22-07-2008 | 256                         | 446                       | 90 cm diep  | 29-08-2008 | 129                         | 208                       |
| 120 cm diep  | 22-07-2008 | 259                         | 411                       | 120 cm diep | 29-08-2008 | 129                         | 200                       |
| 150 cm diep  | 22-07-2008 | 255                         | 402                       | 150 cm diep | 29-08-2008 | 129                         | 197                       |
| 0 cm diep  | 30-07-2008 | 195                         | 296                       | 0 cm diep   | 16-09-2008 | 68                          | 98                        |
| 30 cm diep   | 30-07-2008 | 192                         | 280                       | 30 cm diep  | 16-09-2008 | 69                          | 100                       |
| 60 cm diep   | 30-07-2008 | 173                         | 251                       | 60 cm diep  | 16-09-2008 | 69                          | 94                        |
| 90 cm diep   | 30-07-2008 | 176                         | 253                       | 90 cm diep  | 16-09-2008 | 71                          | 106                       |
| 120 cm diep  | 30-07-2008 | 163                         | 234                       | 120 cm diep | 16-09-2008 | 70                          | 95                        |
| 150 cm diep  | 30-07-2008 | 143                         | 192                       | 150 cm diep | 16-09-2008 | 69                          | 95                        |
| 0 cm diep  | 06-08-2008 | 168                         | 343                       | 0 cm diep   | 24-09-2008 | 42                          | 50                        |
| 30 cm diep   | 06-08-2008 | 171                         | 237                       | 30 cm diep  | 24-09-2008 | 43                          | 59                        |
| 60 cm diep   | 06-08-2008 | 170                         | 243                       | 60 cm diep  | 24-09-2008 | 42                          | 61                        |
| 90 cm diep   | 06-08-2008 | 171                         | 249                       | 90 cm diep  | 24-09-2008 | 43                          | 60                        |
| 120 cm diep  | 06-08-2008 | 169                         | 252                       | 120 cm diep | 24-09-2008 | 43                          | 60                        |
| 150 cm diep  | 06-08-2008 | 171                         | 200                       | 150 cm diep | 24-09-2008 | 43                          | 59                        |

\*: Rood: uitbijters

## BIJLAGE 3

## Resultaten vergelijkend onderzoek blauwalgen monitoring STOWA 2008

| code        | Chlorofyl<br>[µg/L] | Microcystine<br>[µg/L] | Quickscan<br>klasse | Biovolume<br>[mm <sup>3</sup> /L] | Celdichtheid<br>[cellen/ml] | dominante soort(en) * |     |     |     |  |
|-------------|---------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|--|
| MYC UvA     | 277                 | 2388                   | 5                   | 15                                | 636361                      | MYC                   |     |     |     |  |
| PLA UvA     | 387                 | 1,1                    | 5                   | 2                                 | 17280                       |                       | PLA |     |     |  |
| ANA UvA     | 232                 | 1,1                    | 5                   | 20                                | 1120000                     |                       |     | ANA |     |  |
| APH UvA     | 296                 | 1,4                    | 5                   | 14                                | 468000                      |                       |     |     | APH |  |
| SLO PL1     | 249                 | 10,5                   | 3                   | 159                               | 2545633                     | MYC                   |     |     |     |  |
| OUK PLA     | 70                  | 5,2                    | 3                   | 23                                | 396016                      | MYC                   | PLA | ANA |     |  |
| ZWE MOS     | 166                 | 24                     | 3                   | 11                                | 203280                      | MYC                   |     |     |     |  |
| FOR RH      | 58                  | 10,3                   | 3                   | 8                                 | 179722                      | MYC                   | PLA |     |     |  |
| URS PLA     | 6209                | 26                     | 5                   | 543                               | 6452245                     |                       |     |     | ANA |  |
| SLO PL2     | 15                  | 7,7                    | 2                   | 8                                 | 86727                       |                       |     |     | ANA |  |
| GEE 2KA     | 249                 | 1,0                    | 4                   | 108                               | 1167082                     |                       |     |     | ANA |  |
| GEE 4MS     | 954                 | 1,8                    | 4                   | 96                                | 1698163                     |                       |     |     | ANA |  |
| URS DRIJ    | 8786                | 25,3                   | 5                   | 3432                              | 28425306                    |                       |     |     | ANA |  |
| URS BDR     | 204                 | 1,5                    | 3                   | 26                                | 284991                      |                       |     |     | ANA |  |
| KIN BAD     | 115                 | 32                     | 5                   | 61                                | 1446143                     |                       | PLA |     |     |  |
| KIN VRK     | 125                 | 37                     | 5                   | 53                                | 1255080                     |                       | PLA |     |     |  |
| SLO ZZ1     | 52                  | 2,7                    | 3                   | 93                                | 441539                      | MYC                   |     | ANA | APH |  |
| SLO ZZ2     | 860                 | 4,3                    | 4                   | 301                               | 4746703                     | MYC                   |     | ANA |     |  |
| MYC UvA 1** | 203                 | 1940                   | 5                   | 27                                | 614400                      | MYC                   |     |     |     |  |
| MYC UvA 2   | 203                 | 1940                   | 5                   | 22                                | 1325000                     | MYC                   |     |     |     |  |
| MYC UvA 3   | 203                 | 1940                   | 5                   | 49                                | 2267333                     | MYC                   |     |     |     |  |
| gemiddeld   |                     |                        |                     | 33                                | 1402244                     | MYC                   |     |     |     |  |
| ± sd        |                     |                        |                     | 14                                | 829169                      | MYC                   |     |     |     |  |
| PLA UvA 1** | 347                 | 1,5                    | 5                   | 44                                | 480604                      |                       | PLA |     |     |  |
| PLA UvA 2   | 347                 | 1,5                    | 5                   | 27                                | 564583                      |                       | PLA |     |     |  |
| PLA UvA 3   | 347                 | 1,5                    | 5                   | 29                                | 437775                      |                       | PLA |     |     |  |
| gemiddeld   |                     |                        |                     | 33                                | 494321                      |                       | PLA |     |     |  |
| ± sd        |                     |                        |                     | 9                                 | 64507                       |                       | PLA |     |     |  |
| ANA UvA 1** | 238                 | 1,3                    | 5                   | 32                                | 788078                      |                       |     | ANA |     |  |
| ANA UvA 2   | 238                 | 1,3                    | 5                   | 14                                | 673750                      |                       |     | ANA |     |  |
| ANA UvA 3   | 238                 | 1,3                    | 5                   | 46                                | 1292770                     |                       |     | ANA |     |  |
| gemiddeld   |                     |                        |                     | 31                                | 918199                      |                       |     | ANA |     |  |
| ± sd        |                     |                        |                     | 16                                | 329386                      |                       |     | ANA |     |  |
| APH UvA 1** | 148                 | 1,1                    | 5                   | 20                                | 188055                      |                       |     |     | APH |  |
| APH UvA 2   | 148                 | 1,1                    | 5                   | 20                                | 302576                      |                       |     |     | APH |  |
| APH UvA 3   | 148                 | 1,1                    | 5                   | 13                                | 193465                      |                       |     |     | APH |  |
| gemiddeld   |                     |                        |                     | 18                                | 228032                      |                       |     |     | APH |  |
| ± sd        |                     |                        |                     | 4                                 | 64614                       |                       |     |     | APH |  |

Codes: MYC UvA = *Microcystis*, kweek Universiteit van Amsterdam [UvA]; PLA UvA = *Planktothrix* kweek UvA; ANA UvA = *Anabaena* kweek UvA; APH = *Aphanizomenon* kweek UvA; SLO PL1: Slotterplas 1; OUK PLA = Ouderkerkerplas; ZWE MOS = Zwemlust, bij mosselbank; FOR RH = Fortgracht Ruigenhoek; URS PLA = Ursemmerplas; SLO PL2: Slotterplas 2; GEE 2KA = Geestmerambacht 2, bij kabelbaan; GEE 4MS = Geestmerambacht 4, midden strand; URS DRIJ = Ursemmerplas, drijfslaag; URS BDR = Ursemmerplas, buiten drijfslaag; KIN BAD = Kinselmeer, Badhoeve; KIN VRK = Kinselmeer, vereniging recreanten Kinselmeer; SLO ZZ1 = Slotterplas, zwemzone zuid 1; SLO ZZ2 = Slotterplas, zwemzone zuid 2

\*: MYC = *Microcystis* (geel); PLA = *Planktothrix* (groen); ANA = *Anabaena* (blauw) en APH = *Aphanizomenon* (rood)

\*\* : dezelfde monsters werden microscopisch onderzocht door drie verschillende laboratoria

## BIJLAGE 4

| Resultaten blauwalgen onderzoek EWACS 2008 |            |                        |                   |                          |                       |     |     |
|--|------------|------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|-----|-----|
| code                                       | Tijd week# | Cyano chlorofyl [µg/L] | Biovolume [mm3/L] | Celdichtheid [cellen/ml] | Dominante soort[en] * |     |     |
| SBI025                                     | 27         | 4                      | 0,4               | 4022                     | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 29         | 10                     | 2,2               | 46504                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 30         | 12                     | 9,1               | 236951                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 31         | 30                     | 12,2              | 3199 (uitbijter)         | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 32         | 36                     | 16,7              | 245043                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 33         | 20                     | 6,0               | 108743                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 34         | 19                     | 4,9               | 85088                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 35         | 12                     | 1,7               | 27566                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 36         | 8                      | 4,1               | 105225                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 37         | 11                     | 0,4               | 18731                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 38         | 7                      | 1,1               | 34368                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 39         | 5                      | 0,9               | 20836                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 40         | 7                      | 2,5               | 127081                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI025                                     | 41         | 5                      | 1,3               | 51200                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 27         | 5                      | 0,2               | 2607                     | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 29         | 11                     | 3,9               | 103641                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 30         | 6                      | 1,2               | 98754                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 31         | 36                     | 8,8               | 69007                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 32         | 20                     | 6,3               | 117678                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 33         | 18                     | 2,2               | 45700                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 34         | 10                     | 1,9               | 85093                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 35         | 11                     | 1,7               | 27566                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 36         | 10                     | 3,3               | 71932                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 37         | 9                      | 0,4               | 10928                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 38         | 7                      | 4,0               | 107856                   | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 39         | 4                      | 0,8               | 17855                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 40         | 5                      | 1,8               | 39308                    | MYC                   | ANA |     |
| SBI026                                     | 41         | 5                      | 0,3               | 8817                     | MYC                   | ANA |     |
| R0284                                      | 28         | 8                      | 3,6               | 137109                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 29         | 6                      | 3,5               | 261842                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 30         | 4                      | 0,7               | 44343                    | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 31         | 6                      | 4,4               | 222768                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 32         | 5                      | 1,0               | 47179                    | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 33         | 33                     | 7,7               | 250018                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 34         | 16                     | 3,1               | 161093                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 35         | 22                     | 6,2               | 232803                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 37         | 15                     | 3,9               | 162125                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 38         | 15                     | 5,6               | 294134                   | MYC                   |     | APH |
| R0284                                      | 39         | 10                     | 2,4               | 221903                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 28         | 10                     | 2,9               | 267195                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 29         | 5                      | 3,3               | 273350                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 30         | 6                      | 0,7               | 93826                    | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 31         | 8                      | 1,5               | 126196                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 32         | 21                     | 3,8               | 197574                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 33         | 25                     | 7,9               | 299520                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 34         | 29                     | 5,5               | 166484                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 35         | 32                     | 8,9               | 276599                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 36         | 22                     | 9,0               | 415502                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 37         | 15                     | 3,6               | 257281                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 38         | 12                     | 3,3               | 339028                   | MYC                   |     | APH |
| R0865                                      | 39         | 11                     | 1,6               | 222433                   | MYC                   |     | APH |

Codes: SBI025 en SBI026 = Sloterplas; R0284 en R0865 = Westeinderplassen

\*: MYC = *Microcystis* (geel); PLA = *Planktothrix* (groen); ANA = *Anabaena* (blauw) en APH = *Aphanizomenon* (rood)

## BIJLAGE 5

## Resultaten blauwalgen onderzoek HHNK/Waternet 2009

| omschrijving  | datum      | cyano-CHL<br>Probe<br>µg/L | Celdichtheid<br>Microscop<br>cellen/ml | microcystine<br>µg/L | quickscan<br>klasse | dominante<br>soort(en) * |
|---------------|------------|----------------------------|--|----------------------|---------------------|--------------------------|
| Waternet 2009 |            |                            |  |                      |                     |                          |
| PMD001        | 07-07-2009 | 803                        | 253350                                 | 118                  |                     | APH                      |
| SBI017        | 07-07-2009 | 8                          | 42652                                  |                      | MYC                 |                          |
| HBP013        | 20-07-2009 | 15                         | 684958                                 |                      |                     | ANA                      |
| HBP012        | 21-07-2009 | 14                         | 438391                                 |                      |                     | ANA                      |
| SBI017        | 21-07-2009 | 32                         | 161134                                 | 366                  | MYC                 | ANA                      |
| HBP013        | 27-07-2009 |                            | 251927000                              | 153                  |                     | ANA                      |
| HBP013        | 18-08-2009 | 25.3                       | 1000625                                | 5.2                  |                     | PLA ANA                  |
| SBI017        | 18-08-2009 | 52.9                       | 286042                                 | 233                  | MYC                 | ANA                      |
| SBI017        | 24-08-2009 | 86.1                       | 169190                                 |                      | MYC                 | ANA                      |
| PMD001        | 31-08-2009 | 213.9                      | 200489                                 | 32                   | MYC                 |                          |
| HBP012        | 01-09-2009 | 22.5                       | 397127                                 |                      |                     | PLA                      |
| PMD001        | 07-09-2009 |                            | 4357669                                |                      |                     | APH                      |
| SBI017        | 07-09-2009 |                            | 135782                                 |                      | MYC                 |                          |
| HHNK 2009     |            |                            |  |                      |                     |                          |
| 533013        | 04-08-2009 | 296                        | 759915                                 | 112                  | 4                   | ANA APH                  |
| 533013        | 11-08-2009 | 11                         |  | <1                   | 3                   | APH                      |
| 533013        | 25-08-2009 | 1489                       | 2735375                                |                      | 4                   | ANA APH                  |
| 533020        | 21-07-2009 | 4                          | 165231                                 | <1                   | 3                   | ANA                      |
| 533020        | 28-07-2009 | 256                        | 1483595                                | 14                   |                     | ANA                      |
| 533020        | 21-07-2009 | 7499                       | 6488238                                | 15                   | 5                   | ANA                      |
| 533020        | 28-07-2009 | 6                          |  | 1.7                  |                     | ANA                      |
| 533025        | 21-07-2009 | 35                         | 228220                                 |                      | 3                   | ANA                      |
| 533025        | 28-07-2009 | 230                        | 3344676                                | 29                   |                     | ANA                      |
| 533025        | 21-07-2009 | 4406                       | 4592943                                |                      | 4                   | ANA                      |
| 533025        | 28-07-2009 | 8                          |  | 1.5                  |                     | ANA                      |
| 533025        | 11-08-2009 | 6                          |  | 1.1                  | 2                   | APH                      |
| 533025        | 25-08-2009 | 722                        | 15340680                               | 27                   | 4                   | APH                      |
| 618001        | 20-07-2009 | 6                          | 146501                                 |                      | 3                   | ANA                      |
| 618001        | 27-07-2009 | 37                         |  | 1.3                  |                     | ANA                      |
| 618001        | 27-07-2009 | 99908                      | 121409600                              | 6.6                  |                     | ANA                      |
| 618001        | 03-08-2009 | 19012                      |  | 37                   | 5                   | APH                      |
| 618001        | 10-08-2009 | 94                         |  | 1.8                  |                     | ANA                      |
| 618001        | 24-08-2009 | 36513                      | 166900000                              | >400                 | 3                   | MYC APH                  |
| 618001        | 24-08-2009 | 14                         | 342500                                 |                      | 3                   | APH                      |
| 618001        | 24-08-2009 | 19                         |  | 13                   |                     | APH                      |
| 618001        | 31-08-2009 | 6                          |  | 5.3                  |                     | ANA                      |
| 618001        | 07-09-2009 | 29134                      | 174809225                              | >400                 | 5                   | MYC ANA                  |
| 618001        | 07-09-2009 | 4                          |  | 3.6                  |                     | MYC                      |

Codes: PMD001 = Zwembad Zwemlust; SBI017 = Sloterplas; HBP012 = Ouderkerkerplas, groenstrand; HBP013 = Ouderkerkerplas, zandstrand;

533013 = Jagersplas, de Watersnip; 533020 = Jagersplas, de Smient; 533025 = Jagersplas, de Kuifeend; 618001 = Ursummerplas

\*: MYC = *Microcystis* (geel); PLA = *Planktothrix* (groen); ANA = *Anabaena* (blauw) en APH = *Aphanizomenon* (rood)

**BIJLAGE 6****Statistische onderbouwing van het onderzoek (Dr. Theo Janse, Waternet)**

Ter statistische bewerking zijn vier datasets geanalyseerd met het pakket "Statgraphics Plus".

**1 "STATISTIEK CEL-CHL"****SIMPLE REGRESSION - CELDICHTH. MICROSC. VS. CYANO CHL. PROBE (1 UITBIJTER)****Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$** 

Dependent variable: Celdichth. microsc.

Independent variable: Cyano Chl. probe

Selection variable: nr<>91

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 110191,0 | 19699,5        | 5,59362     | 0,0000  |
| Slope     | 2799,64  | 845,955        | 3,30944     | 0,0016  |

**Analysis of Variance**

| Source        | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model         | 1,26258E11     | 1  | 1,26258E11  | 10,95   | 0,0016  |
| Residual      | 7,03204E11     | 61 | 1,15279E10  |         |         |
| Total (Corr.) | 8,29462E11     | 62 |             |         |         |

Correlation Coefficient = 0,39015

R-squared = 15,2217 percent

Standard Error of Est. = 107368,0

**THE STATADVISOR**

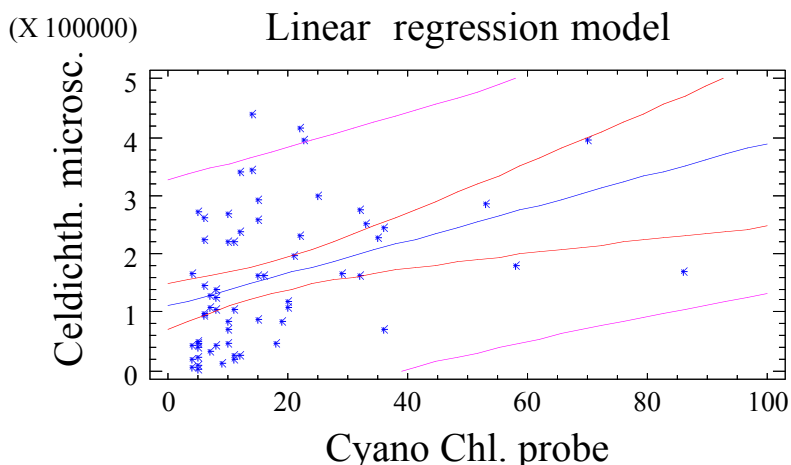
The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Celdichth. microsc. and Cyano Chl. probe. The equation of the fitted model is

$$\text{Celdichth. microsc.} = 110191,0 + 2799,64 \cdot \text{Cyano Chl. probe}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Celdichth. microsc. and Cyano Chl. probe at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 15,2217% of the variability in Celdichth. microsc.

The correlation coefficient equals 0,39015, indicating a relatively weak relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 107368,0. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



#### Analysis of Variance with Lack-of-Fit

| Source        | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model         | 1,26258E11     | 1  | 1,26258E11  | 10,95   | 0,0016  |
| Residual      | 7,03204E11     | 61 | 1,15279E10  |         |         |
| Lack-of-Fit   | 4,1454E11      | 26 | 1,59438E10  | 1,93    | 0,0346  |
| Pure Error    | 2,88664E11     | 35 | 8,24754E9   |         |         |
| Total (Corr.) | 8,29462E11     | 62 |             |         |         |

#### THE STATADVISOR

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is less than 0.05, there is statistically significant lack-of-fit at the 95% confidence level. You might consider selecting a different model form from the Analysis Options dialog box.

#### Predicted Values

| X    | Predicted Y | 95,00% Prediction Limits |          | 95,00% Confidence Limits |          |
|------|-------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
|      |             | Lower                    | Upper    | Lower                    | Upper    |
| 4,0  | 121390,0    | -96106,2                 | 338886,0 | 86605,4                  | 156174,0 |
| 86,1 | 351240,0    | 105237,0                 | 597243,0 | 231144,0                 | 471336,0 |

**THE STATADVISOR**

This table shows the predicted values for *Celdichth. microsc.* using the fitted model.

In addition to the best predictions, the table shows:

- (1) 95,0% prediction intervals for new observations
- (2) 95,0% confidence intervals for the mean of many observations

The prediction and confidence intervals correspond to the inner and outer bounds on the graph of the fitted model.

**Comparison of Alternative Models**

| Model             | Correlation | R-Squared |
|-------------------|-------------|-----------|
| S-curve           | -0,5572     | 31,05%    |
| Multiplicative    | 0,5172      | 26,75%    |
| Reciprocal-X      | -0,4966     | 24,67%    |
| Logarithmic-X     | 0,4909      | 24,10%    |
| Square root-X     | 0,4507      | 20,31%    |
| Double reciprocal | 0,4121      | 16,98%    |
| Square root-Y     | 0,4076      | 16,61%    |
| Exponential       | 0,3904      | 15,24%    |
| Linear            | 0,3901      | 15,22%    |
| Reciprocal-Y      |             | <no fit>  |
| Logistic          |             | <no fit>  |
| Log probit        |             | <no fit>  |

**THE STATADVISOR**

This table shows the results of fitting several curvilinear models to the data. Of the models fitted, the S-curve model yields the highest R-Squared value with 31,0484%. This is 15,8267% higher than the currently selected linear model. To change models, select the Analysis Options dialog box.

**Unusual Residuals**

| Row | X    | Y        | Y        | Predicted Residual | Studentized Residual |
|-----|------|----------|----------|--------------------|----------------------|
| 50  | 22,0 | 415502,0 | 171783,0 | 243719,0           | 2,38                 |
| 56  | 14,0 | 438391,0 | 149386,0 | 289005,0           | 2,87                 |
| 59  | 86,1 | 169190,0 | 351240,0 | -182050,0          | -2,10                |
| 60  | 22,5 | 397127,0 | 173183,0 | 223944,0           | 2,17                 |

**THE STATADVISOR**

The table of unusual residuals lists all observations which have Studentized residuals greater than 2.0 in absolute value. Studentized residuals measure how many standard deviations each observed value of *Celdichth. microsc.* deviates from a model fitted using all of the data except that observation. In this case, there are 4 Studentized residuals greater than 2.0, but none greater than 3.0.

**2 "STATISTIEK BIO-CHL"**

Simple Regression - Biovol\_microsc vs. Cyano\_Ch1\_probe

**Regression Analysis - Linear model: Y = a + b\*X**

Dependent variable: Biovol\_microsc

Independent variable: Cyano\_Ch1\_probe

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 0,74464  | 0,217585       | 3,42229     | 0,0008  |
| Slope     | 0,263235 | 0,0164811      | 15,9719     | 0,0000  |

**Analysis of Variance**

| Source        | Sum of Squares | Df  | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Model         | 1104,3         | 1   | 1104,3      | 255,10  | 0,0000  |
| Residual      | 623,355        | 144 | 4,32886     |         |         |
| Total (Corr.) | 1727,66        | 145 |             |         |         |

Correlation Coefficient = 0,799494

R-squared = 63,9191 percent

Standard Error of Est. = 2,08059

**THE STATADVISOR**

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Biovol\_microsc and Cyano\_Ch1\_probe. The equation of the fitted model is

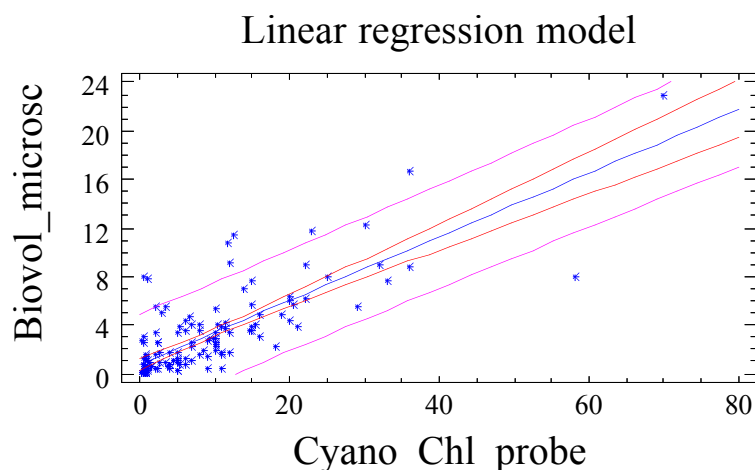
$$\text{Biovol\_microsc} = 0,74464 + 0,263235 * \text{Cyano\_Ch1\_probe}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Biovol\_microsc and Cyano\_Ch1\_probe at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 63,9191% of the variability in Biovol\_microsc. The correlation coefficient equals 0,799494, indicating a moderately strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 2,08059.

This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



**ANALYSIS OF VARIANCE WITH LACK-OF-FIT**

| Source        | Sum of Squares | Df  | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Model         | 1104,3         | 1   | 1104,3      | 255,10  | 0,0000  |
| Residual      | 623,355        | 144 | 4,32886     |         |         |
| Lack-of-Fit   | 465,461        | 100 | 4,65461     | 1,30    | 0,1681  |
| Pure Error    | 157,895        | 44  | 3,58851     |         |         |
| Total (Corr.) | 1727,66        | 145 |             |         |         |

**THE STATADVISOR**

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, the model appears to be adequate for the observed data.

**Predicted Values**

| X    | Predicted Y | 95,00% Prediction Limits |         | 95,00% Confidence Limits |         |
|------|-------------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|
|      |             | Lower                    | Upper   | Lower                    | Upper   |
| 0,24 | 0,807816    | -3,32657                 | 4,9422  | 0,382477                 | 1,23316 |
| 70,0 | 19,1711     | 14,5778                  | 23,7643 | 17,1251                  | 21,217  |

**THE STATADVISOR**

This table shows the predicted values for Biovol\_microsc using the fitted model. In addition to the best predictions, the table shows:

- (1) 95,0% prediction intervals for new observations
- (2) 95,0% confidence intervals for the mean of many observations

The prediction and confidence intervals correspond to the inner and outer bounds on the graph of the fitted model.

**Comparison of Alternative Models**

| Model             | Correlation | R-Squared |
|-------------------|-------------|-----------|
| Linear            | 0,7995      | 63,92%    |
| Square root-X     | 0,7594      | 57,67%    |
| Square root-Y     | 0,7555      | 57,08%    |
| Multiplicative    | 0,7407      | 54,87%    |
| S-curve           | -0,6641     | 44,10%    |
| Logarithmic-X     | 0,6467      | 41,83%    |
| Exponential       | 0,6009      | 36,11%    |
| Reciprocal-X      | -0,4403     | 19,38%    |
| Double reciprocal | 0,3943      | 15,55%    |
| Reciprocal-Y      |             | <no fit>  |
| Logistic          |             | <no fit>  |
| Log probit        |             | <no fit>  |

**THE STATADVISOR**

This table shows the results of fitting several curvilinear models to the data. Of the models fitted, the linear model yields the highest R-Squared value with 63,9191%. This is the currently selected model.

**Unusual Residuals**

| Row | X    | Y     | Predicted Y | Residual | Studentized Residual |
|-----|------|-------|-------------|----------|----------------------|
| 1   | 70,0 | 23,0  | 19,1711     | 3,82893  | 2,15                 |
| 2   | 58,0 | 8,0   | 16,0123     | -8,01225 | -4,48                |
| 6   | 12,0 | 9,1   | 3,90346     | 5,19654  | 2,56                 |
| 8   | 36,0 | 16,7  | 10,2211     | 6,47891  | 3,31                 |
| 55  | 12,4 | 11,4  | 4,00875     | 7,39125  | 3,72                 |
| 67  | 22,9 | 11,7  | 6,77271     | 4,92729  | 2,43                 |
| 104 | 11,8 | 10,74 | 3,85081     | 6,88919  | 3,45                 |
| 109 | 2,24 | 5,56  | 1,33429     | 4,22571  | 2,06                 |
| 123 | 1,19 | 7,81  | 1,05789     | 6,75211  | 3,38                 |
| 128 | 0,51 | 8,02  | 0,878889    | 7,14111  | 3,59                 |

**THE STATADVISOR**

The table of unusual residuals lists all observations which have Studentized residuals greater than 2.0 in absolute value. Studentized residuals measure how many standard deviations each observed value of Biovol\_microsc deviates from a model fitted using all of the data except that observation. In this case, there are 10 Studentized residuals greater than 2.0, 6 greater than 3.0. You should take a careful look at the observations greater than 3.0 to determine whether they are outliers which should be removed from the model and handled separately.

**3 "STATISTIEK CEL-BIO"**

Simple Regression - Celdichth. microsc. vs. Biovol. microsc.

**Regression Analysis - Linear model:  $Y = a + b \cdot X$** 

Dependent variable: Celdichth. microsc.

Independent variable: Biovol. microsc.

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 85537,1  | 15971,4        | 5,35565     | 0,0000  |
| Slope     | 12904,8  | 2311,12        | 5,5838      | 0,0000  |

**Analysis of Variance**

| Source        | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model         | 2,35254E11     | 1  | 2,35254E11  | 31,18   | 0,0000  |
| Residual      | 3,99902E11     | 53 | 7,54532E9   |         |         |
| Total (Corr.) | 6,35156E11     | 54 |             |         |         |

Correlation Coefficient = 0,608595

R-squared = 37,0388 percent

Standard Error of Est. = 86863,8

**THE STATADVISOR**

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Celdichth. microsc. and Biovol. microsc.. The equation of the fitted model is

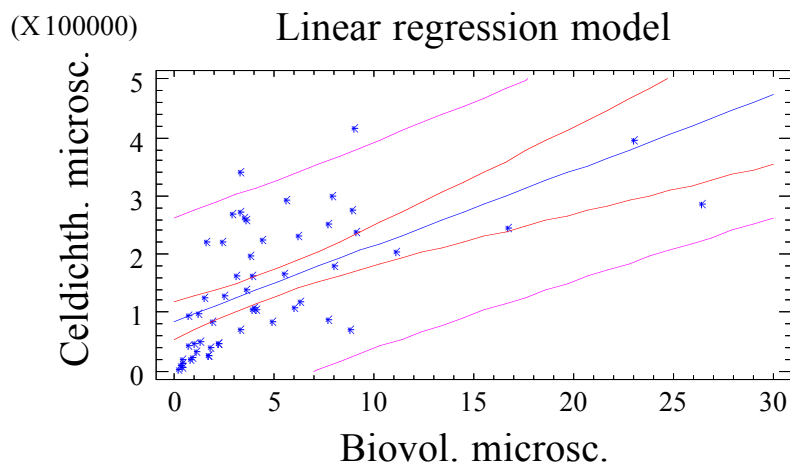
Celdichth. microsc. = 85537,1 + 12904,8 \* Biovol. microsc.

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Celdichth. microsc. and Biovol. microsc. at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains

37,0388% of the variability in Celdichth. microsc.. The correlation coefficient equals 0,608595, indicating a moderately strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 86863,8.

This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



#### Analysis of Variance with Lack-of-Fit

| Source        | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| Model         | 2,35254E11     | 1  | 2,35254E11  | 31,18   | 0,0000  |
| Residual      | 3,99902E11     | 53 | 7,54532E9   |         |         |
| Lack-of-Fit   | 3,37565E11     | 43 | 7,85035E9   | 1,26    | 0,3654  |
| Pure Error    | 6,23368E10     | 10 | 6,23368E9   |         |         |
| Total (Corr.) | 6,35156E11     | 54 |             |         |         |

#### THE STATADVISOR

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is greater or equal to 0.10, the model appears to be adequate for the observed data.

#### Predicted Values

| X    | Predicted Y | 95,00% Prediction Limits |          | 95,00% Confidence Limits |          |
|------|-------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
|      |             | Lower                    | Upper    | Lower                    | Upper    |
| 0,2  | 88118,0     | -88918,0                 | 265154,0 | 56706,4                  | 119530,0 |
| 26,4 | 426224,0    | 223672,0                 | 628776,0 | 322918,0                 | 529530,0 |

**THE STATADVISOR**

This table shows the predicted values for *Celdichth. microsc.* using the fitted model. In addition to the best predictions, the table shows:

- (1) 95,0% prediction intervals for new observations
- (2) 95,0% confidence intervals for the mean of many observations

The prediction and confidence intervals correspond to the inner and outer bounds on the graph of the fitted model.

**Comparison of Alternative Models**

| Model             | Correlation | R-Squared |
|-------------------|-------------|-----------|
| Double reciprocal | 0,8746      | 76,49%    |
| S-curve           | -0,8296     | 68,83%    |
| Multiplicative    | 0,8168      | 66,72%    |
| Logarithmic-X     | 0,7148      | 51,10%    |
| Square root-X     | 0,6916      | 47,82%    |
| Linear            | 0,6086      | 37,04%    |
| Square root-Y     | 0,5914      | 34,98%    |
| Reciprocal-X      | -0,5528     | 30,56%    |
| Exponential       | 0,5315      | 28,25%    |
| Reciprocal-Y      |             | <no fit>  |
| Logistic          |             | <no fit>  |
| Log probit        |             | <no fit>  |

**THE STATADVISOR**

This table shows the results of fitting several curvilinear models to the data. Of the models fitted, the double reciprocal model yields the highest R-Squared value with 76,4932%. This is 39,4544% higher than the currently selected linear model. To change models, select the Analysis Options dialog box.

**UNUSUAL RESIDUALS**

| Row | X    | Predicted<br>Y | Studentized<br>Y | Residual  | Residual |
|-----|------|----------------|------------------|-----------|----------|
| 5   | 26,4 | 284991,0       | 426224,0         | -141233,0 | -2,08    |
| 52  | 9,0  | 415502,0       | 201680,0         | 213822,0  | 2,64     |
| 54  | 3,3  | 339028,0       | 128123,0         | 210905,0  | 2,58     |

**THE STATADVISOR**

The table of unusual residuals lists all observations which have Studentized residuals greater than 2.0 in absolute value. Studentized residuals measure how many standard deviations each observed value of *Celdichth. microsc.* deviates from a model fitted using all of the data except that observation. In this case, there are 3 Studentized residuals greater than 2.0, but none greater than 3.0.

**4 "STATISTIEK CHLOROFYL"****Regression Analysis - Linear model: Y = a + b\*X**

Dependent variable: Chl\_NEN

Independent variable: Chl\_probe

Selection variable: nr<>262

| Parameter | Estimate | Standard Error | T Statistic | P-Value |
|-----------|----------|----------------|-------------|---------|
| Intercept | 1,61167  | 3,05585        | 0,527405    | 0,5987  |
| Slope     | 1,61422  | 0,0275198      | 58,6567     | 0,0000  |

**Analysis of Variance**

| Source        | Sum of Squares | Df  | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Model         | 2,56621E6      | 1   | 2,56621E6   | 3440,60 | 0,0000  |
| Residual      | 105166,0       | 141 | 745,862     |         |         |
| Total (Corr.) | 2,67138E6      | 142 |             |         |         |

Correlation Coefficient = 0,980118

R-squared = 96,0632 percent

Standard Error of Est. = 27,3105

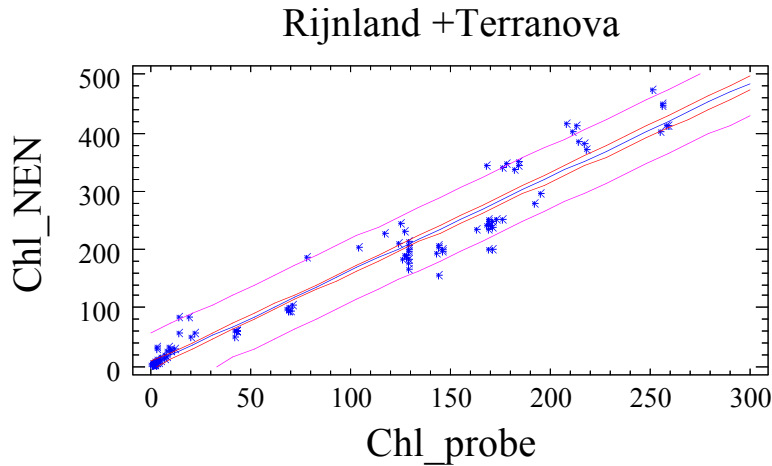
**THE STATADVISOR**

The output shows the results of fitting a linear model to describe the relationship between Chl\_NEN and Chl\_probe. The equation of the fitted model is

$$\text{Chl\_NEN} = 1,61167 + 1,61422 * \text{Chl\_probe}$$

Since the P-value in the ANOVA table is less than 0.01, there is a statistically significant relationship between Chl\_NEN and Chl\_probe at the 99% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 96,0632% of the variability in Chl\_NEN. The correlation coefficient equals 0,980118, indicating a relatively strong relationship between the variables. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 27,3105. This value can be used to construct prediction limits for new observations by selecting the Forecasts option from the text menu.



#### Analysis of Variance with Lack-of-Fit

| Source        | Sum of Squares | Df  | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|---------------|----------------|-----|-------------|---------|---------|
| Model         | 2,56621E6      | 1   | 2,56621E6   | 3440,60 | 0,0000  |
| Residual      | 105166,0       | 141 | 745,862     |         |         |
| Lack-of-Fit   | 88871,3        | 106 | 838,408     | 1,80    | 0,0245  |
| Pure Error    | 16295,2        | 35  | 465,577     |         |         |
| Total (Corr.) | 2,67138E6      | 142 |             |         |         |

#### THE STATADVISOR

The lack of fit test is designed to determine whether the selected model is adequate to describe the observed data, or whether a more complicated model should be used. The test is performed by comparing the variability of the current model residuals to the variability between observations at replicate values of the independent variable X. Since the P-value for lack-of-fit in the ANOVA table is less than 0.05, there is statistically significant lack-of-fit at the 95% confidence level. You might consider selecting a different model form from the Analysis Options dialog box.

**PREDICTED VALUES**

| Predicted |         | 95,00%<br>Prediction Limits |         | 95,00%<br>Confidence Limits |         |
|-----------|---------|-----------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| X         | Y       | Lower                       | Upper   | Lower                       | Upper   |
| 0,27      | 2,04751 | -52,2794                    | 56,3744 | -3,98396                    | 8,07897 |
| 259,0     | 419,694 | 364,586                     | 474,803 | 408,652                     | 430,737 |

**THE STATADVISOR**

This table shows the predicted values for Chl\_NEN using the fitted model. In addition to the best predictions, the table shows:

- (1) 95,0% prediction intervals for new observations
- (2) 95,0% confidence intervals for the mean of many observations

The prediction and confidence intervals correspond to the inner and outer bounds on the graph of the fitted model.

**Comparison of Alternative Models**

| Model             | Correlation | R-Squared |
|-------------------|-------------|-----------|
| Multiplicative    | 0,9836      | 96,75%    |
| Linear            | 0,9801      | 96,06%    |
| Square root-Y     | 0,9716      | 94,39%    |
| Square root-X     | 0,9533      | 90,88%    |
| Exponential       | 0,8853      | 78,37%    |
| Logarithmic-X     | 0,8761      | 76,75%    |
| Double reciprocal | 0,8288      | 68,69%    |
| S-curve           | -0,7828     | 61,28%    |
| Reciprocal-X      | -0,5728     | 32,81%    |
| Reciprocal-Y      |             | <no fit>  |
| Logistic          |             | <no fit>  |
| Log probit        |             | <no fit>  |

**THE STATADVISOR**

This table shows the results of fitting several curvilinear models to the data. Of the models fitted, the multiplicative model yields the highest R-Squared value with 96,7492%. This is 0,685955% higher than the currently selected linear model. To change models, select the Analysis Options dialog box.



**Unusual Residuals**

| Row | X     | Y     | Predicted<br>Y | Residual | Studentized<br>Residual |
|-----|-------|-------|----------------|----------|-------------------------|
| 60  | 13,5  | 84,0  | 23,4036        | 60,5964  | 2,26                    |
| 83  | 78,0  | 187,0 | 127,521        | 59,4792  | 2,22                    |
| 84  | 178,0 | 346,0 | 288,943        | 57,0573  | 2,13                    |
| 90  | 208,0 | 416,0 | 337,369        | 78,6307  | 3,00                    |
| 92  | 213,0 | 411,0 | 345,44         | 65,5596  | 2,48                    |
| 95  | 211,0 | 401,0 | 342,212        | 58,788   | 2,21                    |
| 96  | 251,0 | 473,0 | 406,781        | 66,2193  | 2,52                    |
| 108 | 168,0 | 343,0 | 272,801        | 70,1995  | 2,65                    |
| 113 | 171,0 | 200,0 | 277,643        | -77,6432 | -2,94                   |
| 114 | 169,0 | 201,0 | 274,415        | -73,4147 | -2,77                   |
| 120 | 144,0 | 157,0 | 234,059        | -77,0593 | -2,91                   |

**THE STATADVISOR**

The table of unusual residuals lists all observations which have Studentized residuals greater than 2.0 in absolute value. Studentized residuals measure how many standard deviations each observed value of Chl\_NEN deviates from a model fitted using all of the data except that observation. In this case, there are 11 Studentized residuals greater than 2.0, but none greater than 3.0