

## Voorschrift quick scan telmethode – versie 2 (19 maart 2009)

Dit voorschrift is samengesteld in opdracht van de Rijkswaterstaat Waterdienst door Edwin Kardinaal (DHV) met medewerking van Ronald Bijkerk (Koeman en Bijkerk bv) en Hans Ruiter (RWS Waterdienst). De tekst is voor een groot deel overgenomen uit het Handboek Hydrobiologie. Het voorschrift kan nog gewijzigd worden naar aanleiding van commentaar uit de Werkgroep Cyanobacteriën en praktijkervaringen met deze versie van het voorschrift.

---

### Inleiding

In het vernieuwde blauwalgenprotocol wordt gestuurd op de dichtheid van blauwalgen en de aanwezigheid van drijfslagen van blauwalgen. Eventuele gifstoffen kunnen in drijfslagen snel ophopen. Er is in het blauwalgenprotocol een aantal grenzen aangegeven waarbij de waterbeheerder actie dient te ondernemen.

Dit voorschrift beschrijft een telmethodiek die ingezet kan worden bij de monitoring van de blauwalgen (voor monsternamen wordt verwezen naar: Inspectie- en Bemonsteringsprotocol Blauwalgen). De methode is erop gericht om snel en betrouwbaar een kwantitatief beeld te geven van de dichtheden van de potentieel toxische blauwalgen. De methode is snel door een korte analysetijd en het feit dat alleen de in het blauwalgenprotocol genoemde potentieel toxische geslachten geteld moeten worden.

### Beginsel van de bemonstering en analyse

Voor identificatie hebben levende monsters de voorkeur. Tellingen moeten echter altijd worden uitgevoerd aan lugolgeconserveerde monsters volgens de Utermöhl-methode (NEN-EN 15204). Om een dichtheid van 100 000 cellen/ml betrouwbaar te kunnen bepalen moet in de regel 0.2 tot 1.0 ml monster onderzocht worden.

Een bepaling van de absolute dichtheden van blauwalgencellen in duidelijke drijfslagen (categorie 2 of 3) is niet nodig, de aanwezigheid van de drijfslag leidt op zich al tot actie (zwemmen ontraden of verbieden; zie bijlage blauwalgprotocol). Het is echter wel waardevol het geslacht te weten dat verantwoordelijk is voor vorming van de drijfslag.

### Monster voorbehandeling

Voor tellingen moeten de monsters altijd geconserveerd worden met lugol. Sommige soorten kunnen levend beter worden herkend dan geconserveerd. Een zeker onderscheid tussen blauwalgen en heterotrofe bacteriën kan alleen in levende toestand worden gemaakt. Indien dit relevant is conserveer het monster dan niet, maar sla het in het donker op bij ca 4 °C (maximaal 24 uur). Zorg hierbij dat het monster kan 'ademen' door de dop van fles of pot los te draaien.

#### *Drijfvermogen opheffen*

Een aantal blauwalgensoorten is in staat om, met behulp van gasblaasjes, naar de oppervlakte te drijven. Deze eigenschap bemoeilijkt de uiteindelijke tellingen. Het is dus zaak om de drijvende eigenschap van de cellen op te heffen. Dit kan op twee manieren:

1. klappen van gasblaasjes door middel van overdruk;
2. monster conserveren met Lugol, waardoor cellen uitzakken.

Overdruk kan verkregen worden door een bepaalde hoeveelheid monster op te zuigen in een spuit, vervolgens de spuit dicht te houden (m.b.v. een kurk o.i.d.) en de plunjer van de spuit met kracht terug te duwen. Opmerking: de aanwezigheid van zwevende of aan het wateroppervlak

'klevende' algen dient altijd te worden onderzocht door met een kleine vergroting (4× of 10×) de waterkolom en de meniscus in het cuvet te scannen.

#### *KOH-behandeling voor het tellen van Microcystis*

Watermonster die gedomineerd worden door veel *Microcystis* kolonies, worden eerst behandeld met KOH om zodoende de cellen uit de kolonies los te krijgen. Dit gaat als volgt:

- filter 20 ml van het watermonster over een 45 mm diameter, 0.45 µm pore size HA membraanfilter;
- breng het filter over in een erlenmeyer en voeg 20 ml 0.01 M KOH toe;
- incubeer het geheel gedurende 30 minuten bij 80 °C;
- laat het monster afkoelen en breng 5 ml van het gehomogeniseerde monster over in een reageerbuis;
- roer vervolgens krachtig gedurende 60 seconden, bijvoorbeeld op een vortex.

#### *Acclimatisatie*

Monster, sedimentatiecuvet en verdunningsvloeistof moeten op gelijke temperatuur zijn om een gelijkmatige verdeling van deeltjes over de cuvetbodem te bevorderen. In de praktijk voldoet kamertemperatuur. Indien monsters gekoeld vervoerd of bewaard zijn, laat het monster dan eerst op een donkere plaats op kamertemperatuur komen. Om de acclimatisatie van het monster te versnellen neemt men na homogenisatie een klein deelmonster van enkele milliliters dat men over brengt in een reageerbuis.

#### *Concentreren / verdunnen*

Door een juiste keuze van het in te zetten volume probeert men een optimale dichtheid van algen in het beeldveld te krijgen (5 tot 15). Is dit niet mogelijk binnen een range van 0.2 tot 2.0 ml, dan moet het monster verdund of geconcentreerd worden.

Verdunnen kan met algenvrij leidingwater met lugol, of gedestilleerd water met lugol.

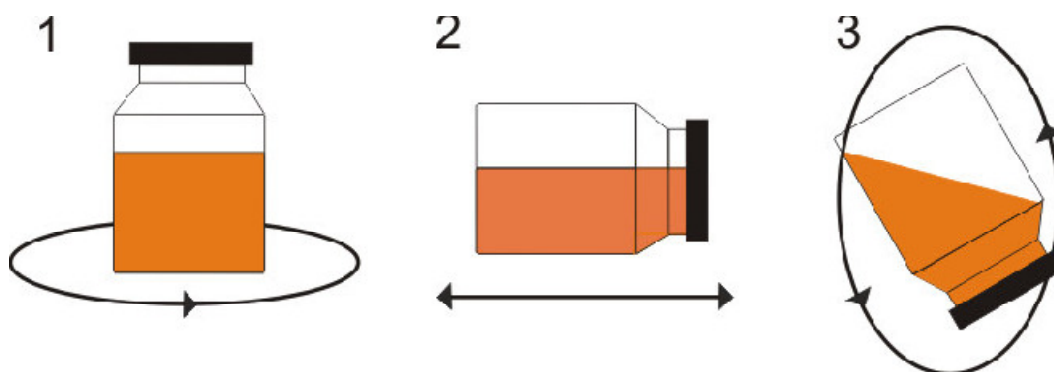
Concentreren kan door sedimentatie (duurt lang), of door centrifugering. Centrifugering gaat als volgt:

- neem 10 ml monster uit de gehomogeniseerde monsternamefles (met geklapt of geconserveerd materiaal) en breng dit over in een punt centrifugeerbuis
- centrifugeer het monster gedurende 10 minuten bij circa 760 g.
- pipetteer een bekende hoeveelheid bovenstaand water af zonder het pellet te verstoren
- homogeniseer de pellet in de resterende vloeistof

Alle concentratie- en verdunningsstappen worden zorgvuldig gedocumenteerd.

#### *Homogenisatie*

Schud het monster gedurende minimaal 30 seconden op drie verschillende wijzen (zie figuur 1). Het schudden dient om alle deeltjes in het monster te resuspenden en te mengen. Hierdoor krijgt men een homogeen monster, waaraan een representatief deelmonster onttrokken kan worden. Vierkante monsterflessen en de opeenvolgende schudbewegingen voorkomen het ontstaan van een kolk die tot een onvolledige menging van deeltjes leidt.



**Figuur 1** Drie opeenvolgende schudbewegingen voor het homogeniseren van een blauwalgenmonster.

## Analyse

### Inzetten

Het inzetten van een deelmonster doorloopt de volgende stappen:

- etiketteer het cuvet met gegevens van het monster;
- breng een bodempje verdunningsvloeistof aan in het cuvet;
- homogeniseer het monster in de monsterfles;
- neem met een volumepipet een toereikende hoeveelheid deelmonster direct uit de monsterfles en breng dit over in het cuvet. Een toereikende hoeveelheid vult het cuvet precies af en leidt tot een random verdeling van deeltjes op de cuvetbodem en een goede dichtheid van deeltjes per beeldveld. Optimaal is een dichtheid tussen tien en twintig deeltjes per beeldveld; werkbaar is een dichtheid tussen twee (bij 200×) en veertig (bij 600×) deeltjes per beeldveld;
- dek het cuvet af met een dekglasje en zorg ervoor dat geen luchtballen onder het dekglas gevangen blijven. Bij bepaalde cuvettypen wordt een dekglasje, dat bij het afvullen reeds halverwege op het cuvet gelegd wordt, na het afvullen door de oppervlaktespanning 'vanzelf' geheel over het cuvet getrokken;
- zet het cuvet voor sedimentatie weg op een trillings- en tochtvrije plaats bij kamertemperatuur gedurende minimaal drie tot vier uur per centimeter waterkolomhoogte (NEN EN 15204).

### Telling

Uit een lugol geconserveerd monster wordt kwantitatief een deelmonster genomen dat overgebracht wordt in een sedimentatiecuvet<sup>1</sup>. Na bezinking worden de blauwalgen gedetermineerd en geteld met behulp van een omgekeerd microscoop, volgens NEN-EN 15204. De hieronder beschreven telstrategie is een effectieve strategie voor een representatieve beschrijving van de soortensamenstelling en abundantie van potentieel toxische blauwalgen.

<sup>1</sup> Cuvetten bestaan in vele soorten en maten. Is het cuvet hoog, dan is de sedimentatietijd relatief lang, maar de analysetijd relatief kort. Is het cuvet laag, dan is de sedimentatietijd relatief kort, maar de analysetijd relatief lang. Analysetijd is arbeidstijd, sedimentatietijd is dat niet. Meer dan twee uur wachten is in het geval van quick scans niet wenselijk. Daarom is een hoogte van 0,5 cm of minder het gunstigst. Bovendien mag het cuvet niet te smal (< 0,5 cm) of te breed (> 2 cm) zijn om zodoende een optimale verdeling van de cellen te realiseren. Daarnaast moet men met het microscoopobjectief ook langs de rand van het cuvet kunnen kijken. Voorbeelden van cuvetten zijn te vinden op: [www.koemanenbijkerk.nl](http://www.koemanenbijkerk.nl) of [www.hydrobios.de](http://www.hydrobios.de).

### *Algemene telstrategie*

Verdeel de telling over twee fasen: 1) Opstellen soortenlijst en 2) Telling in één of meer stappen.

### Fase 1 Soortenlijst

Begin de analyse met het opstellen van een soortenlijst. Maak hiervoor, bij voorkeur, gebruik van een levend monster.

### Fase 2 Tellingen

De stappen verschillen in de sterkte van de gebruikte vergroting en de grootte van het onderzochte volume. Bij gebruik van een rond cuvet: tel beeldvelden in segmenten (taartpunten) van het cuvet, waarbij de beeldvelden verdeeld worden over twee tegenover elkaar liggende taartpunten (zie figuur 2).

Verzamel per stap minimaal tien waarnemingen van de meest talrijke soort, maar tel minimaal vijf beeldvelden.

Soorten waarvan voldoende waarnemingen zijn verzameld, hoeven niet meer te worden geteld in een volgende stap.

Onderzoek minimaal vijf beeldvelden bij een juiste vergroting (200x voor grote kolonies en draden, 400x of 600x voor kleinere cellen, zoals losse *Microcystis*-cellen). Verdeel de telling zo nodig of gewenst in meerdere stappen, als volgt:

Stap 1 Onderzoek enkele beeldvelden (minimaal 5) voor de zeer talrijke soorten;

Stap 2 Onderzoek enkele tientallen beeldvelden voor de talrijke soorten;

Stap 3 Indien gewenst onderzoek voor de minder en minst talrijke soorten een half tot een heel cuvet.

Opmerking: in het kader van het blauwalgenprotocol moet het dichtheidsniveau van het totaal aan potentieel toxische blauwalgen worden vastgesteld. Omdat dit bepaald wordt door de meest talrijke alg zal men in het algemeen kunnen volstaan met een telling in één stap. Zie bijvoorbeeld tabel V-1, waarbij men na het tellen van 1.15% van 1 ml al had kunnen stoppen met de telling.

### *Werkwijze*

- Onderzoek een lugol geconserveerd (deel)monster volgens de hierboven genoemde, algemene telstrategie;
- Tel alleen blauwalgen van de potentieel toxische geslachten (in ieder geval: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Planktothrix* en *Woronichinia*; in de toekomst zal het aantal geslachten mogelijk uitgebreid worden);
- Noteer bij de telling het aantal waarnemingen en het aantal cellen per onderscheiden geslacht;
- In het geval van draden en kolonies waarvan het aantal cellen moeilijk precies te tellen is: maak een zo goed mogelijke schatting van het aantal cellen;
- Determineer en tel minimaal honderd waarnemingen in totaal, tenzij er in 1 ml minder dan honderd aanwezig zijn. Onderzoek in dat geval maximaal 1 ml ongeconcentreerd monster geheel of ga over tot concentratie van het monster volgens bovenstaande procedure.

#### *Tip voor het tellen van draadvormige blauwalgen:*

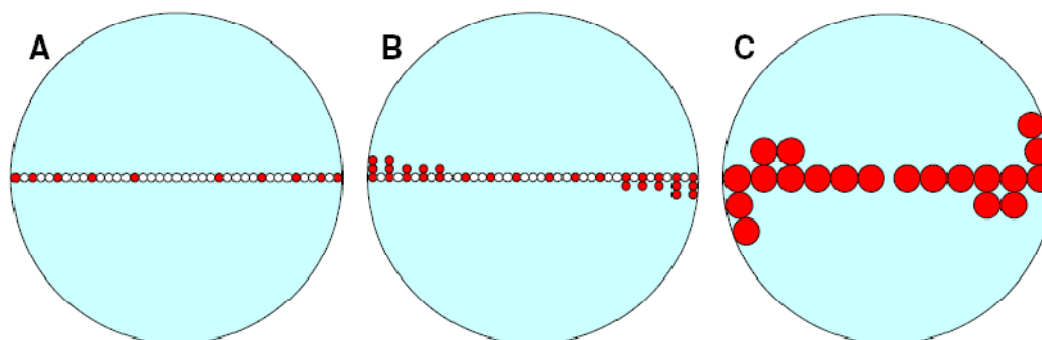
tel eerst het aantal draden en bepaal daarna het gemiddelde aantal cellen per draad. Doe dit door eerst de gemiddelde lengte van dertig volgens het toeval gekozen draden te meten en vervolgens de gemiddelde lengte van een cel te bepalen.

Tabel 1 geeft als voorbeeld het analyseresultaat van een quick scan. In dit voorbeeld had men kunnen volstaan met het tellen van 1.15% van 1 ml, omdat in deze stap het risiconiveau van 200 000 cellen per ml al ruimschoots gepasseerd was.

Wanneer meerdere geslachten (of soorten) aanwezig zijn kan het echter gewenst zijn om ook van deze een betrouwbare dichtheidsschatting te maken. In de monitoring kan men dan toe- of afnames constateren.

Om ook de subdominante geslachten te kwantificeren (zoals in tabel IV-1), bouwt men de telling op in meerdere stappen, volgens de algemene telstrategie. Verdeel daarbij de honderd waarnemingen over de aanwezige geslachten, als volgt:

- dominante geslacht: minimaal vijftig waarnemingen;
- overige geslachten: maximaal ca. vijftig waarnemingen, in verhouding tot hun relatieve abundantie van voorkomen (zie tabel 1).



**Figuur 2** Beeldvelden verdeeld over twee tegenover elkaar liggende taartpunten: de rode cirkeltjes worden in dit geval geteld: A) vergroting 600 $\times$ ; twee keer vijf beeldvelden worden geteld, B) vergroting 600 $\times$ ; twee keer vijftien beeldvelden worden geteld, C) vergroting 200 $\times$ ; twee keer tien beeldvelden worden geteld.

De schets met beeldvelden is gebaseerd op het werken met KenB-cuvetten met objectieven van 20x en 60x.

## Tijdsbesteding

### Analyse

Telling potentieel toxische blauwalgen (quick scan): 0.8 uur (range 0.6 tot 1.0 uur)

Determinatie drijfslaag: 0.5 uur (range 0.3 tot 0.8 uur)

### Rapportage

Samenstelling standaardrapport: 0.5 uur.

## Normen

Onderdelen van dit voorschrift zijn gebaseerd op de volgende normen:

- *NEN-EN 14996* Richtlijn voor de kwaliteitsborging van biologische en ecologische beoordelingen in het aquatische milieu.
- *NEN-EN 15204* Waterkwaliteit - Richtlijn voor het tellen van fytoplankton met behulp van omgekeerde microscopie (Utermöhl-techniek).

**Tabel 1** Analyseresultaat quick scan zwemwatermonster (data Koeman en Bijkerk bv).

<b>Naam</b>	<b>n_Waarn</b>	<b>n_Cel</b>	<b>Cellen/ml</b>	<b>Waarn/ml</b>	<b>%1ml_Geteld</b>
Planktothrix agardhii	104	9048	784055	9012	1.15
Aphanizomenon	12	254	2540	120	10.00
Microcystis	4	800	1600	8	50.00
Woronichinia obtusa	8	746	1492	16	50.00
Anabaena perturbata	16	546	1092	32	50.00
Microcystis flos-aquae	1	300	600	2	50.00
Cuspidothrix issatschenkoi	2	24	240	20	10.00
Aphanizomenon gracile	1	17	170	10	10.00
Anabaena nana	1	80	160	2	50.00
Anabaena	4	70	140	8	50.00
Potentieel toxisch blauwalgen to	153	11885	792089	9230	