



Analyse van monsters uit Almere op aanwezigheid cyanotoxines

M. Lurling

20 oktober 2009

Dit document beschrijft de resultaten van een spoedanalyse van twee potten met cyanobacteriën materiaal op aanwezigheid van cyanotoxines. In opdracht van RWS en de gemeente Almere is het aangeleverde materiaal geanalyseerd op microcystines, saxitoxine en cylindrospermopsine. De analyses zijn uitgevoerd door Wendy Beekman, de rapportage is verzorgd door Miquel Lurling

Leerstoelgroep Aquatische Ecologie & Waterkwaliteitsbeheer

Droevendaalsesteeg 3

6708 PB Wageningen

alternatief:

Postbus 47

6700 AA Wageningen

Tel: 0317-483898

Email: miquel.lurling@wur.nl



www.aew.wur.nl

Inleiding

Cyanobacteriën (blauwalgen) behoren tot de oudste levensvormen die we kennen. Door hun fotosynthetische activiteit hebben de cyanobacteriën er voor gezorgd dat de oeratmosfeer ongeveer 2½ miljard jaar geleden veranderde van een vrijwel zuurstofloze in een zuurstofrijke atmosfeer. Daarnaast staan cyanobacteriën aan de wieg van al het groen wat we in onze omgeving zien. Vandaag de dag zetten cyanobacteriën CO₂ en in het water opgeloste nutriënten om in biomassa. Dit is als positief te duiden ware het niet dat menig cyanobacterie, als minuscule chemische fabriek, ook allerlei gifstoffen (cyanotoxines) kan produceren. Voeg daar het vermogen om aan het wateroppervlak te accumuleren aan toe en tezamen met een briesje levert dat de ingrediënten tot mogelijke sterke concentratie van cyanotoxines aan lager wal.

Er worden verschillende groepen van cyanotoxines onderscheiden waarvan, op basis van de werking, de neurotoxines, cytotoxines en hepatotoxines de belangrijkste zijn. In dit onderzoek is het op donderdag 1 oktober 2009 aangeleverde materiaal onderzocht op saxitoxine, cylindrospermopsine en microcystine.

Saxitoxines remmen de neurologische signaaloverdracht door binding aan de natrium/kaliumkanalen in zenuwcellen. Hierdoor wordt propagatie van de elektrische impuls langs een axon verstoord en zullen bij de synaps geen neurotransmitters (acetylcholine) uitgescheiden worden in de synapsspleet met als gevolg een verstoorde communicatie tussen neuron en spiercel.

Cylindrospermopsine blokkeert de eiwitsynthese, veroorzaakt necrose in lever, nieren, milt, longen en kan tot DNA schade leiden.

Microcystines remmen eiwitfosfatase en resulteren in leverschade doordat ze het cytoskelet van levercellen ernstig kunnen beschadigen. Daarnaast zijn microcystines mogelijk kankerverwekkend.

Cyanotoxine-analyses

Op 1 oktober 2009 werden rond 17:30 uur twee potten met materiaal uit de omgeving van Almere-Haven afgeleverd. Het betrof hier één pot met drijfslaagmateriaal, wat geruimd was op 29 september en waarvan op 1 oktober om 15:45 uur een monster was genomen, en een andere pot met vers drijfslaagmateriaal wat verzameld was bij het zwemstrand op 1 oktober om 15:30 uur (*Figuur 1*). Bij binnenkomst in het laboratorium te Wageningen zijn uit elke pot vijf monsters van 10 ml genomen, waarvan het watergehalte en drooggewicht zijn bepaald. Vijf andere submonsters per pot zijn ingevroren en daarna gedurende 3 dagen gevriesdroogd. Voor de toxine analyses is per analyse 10 mg van het gevriesdroogde materiaal afgewogen en in een glazen buis van 10 ml gebracht.

Microcystine

Voor de microcystine bepaling is 3 ml 50% methanol aan de buizen toegevoegd, het geheel werd goed gemengd, vervolgens gedurende 10 minuten bij 70°C geplaatst, wederom goed gemengd en gecentrifugeerd gedurende 10 minuten bij 5000 rpm. De vloeistof werd overgebracht in een Eppendorf-cup en diende 1000x verdund te worden om aan de voorwaarden voor de analyse te voldoen. De microcystine-concentraties werden bepaald met behulp van een ELISA en is uitgedrukt als MC-LR equivalenten (Envirologix Quantiplate™ for Microcystins, EP022).



Figuur 1: Potten me cyanobacteriemateriaal afgeleverd op 1 oktober 2009.

Cylindrospermopsine

Voor de cylindrospermopsine bepaling is 3 ml nanopuur water toegevoegd aan 10 mg gevriesdroogd materiaal. De suspensie is goed gemengd, 15 minuten in een ultrageluidbad geplaatst, weer gemengd en wederom gedurende 15 minuten in het ultrageluidbad gezet. Daarna is het materiaal gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 5000 rpm en is het supernatant overgebracht in een Eppendorf-cup. De cylindrospermopsine concentraties werden in de onverdunde monsters bepaald met behulp van een ELISA (Abraxis, Cylindrospermopsin ELISA Microtiter Plate, Product No. 522011).

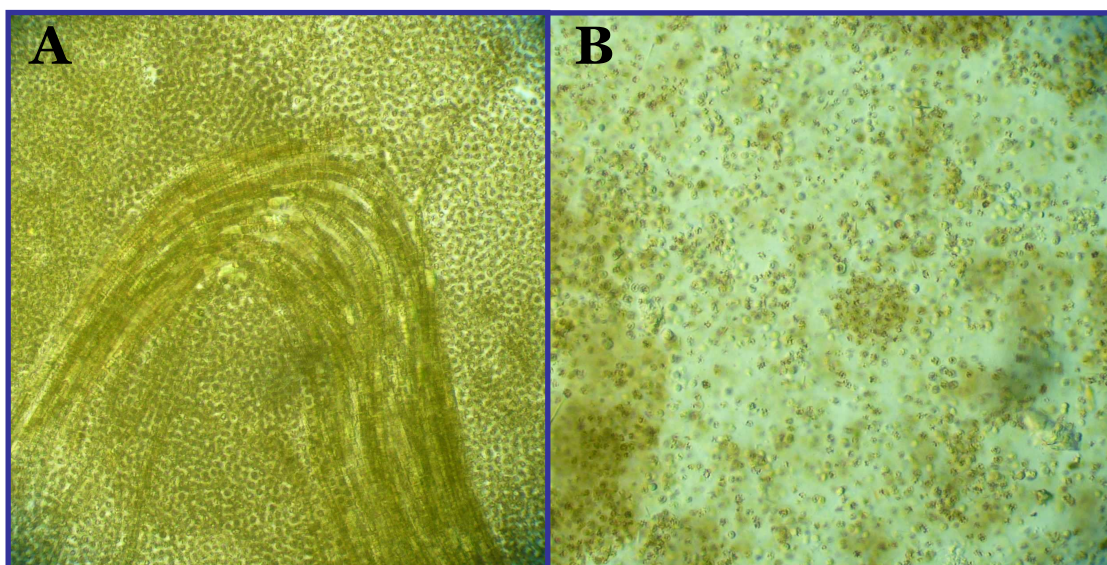
Saxitoxine

De saxitoxines zijn uit 10 mg gevriesdroogd materiaal geëxtraheerd door 3 ml 25% methanol (pH 3.5) toe te voegen en de suspensie eerst 3 uur bij 20°C te schudden en daarna 15 uur bij 4°C weg te zetten. Vervolgens is het geheel goed gemengd, gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 5000 rpm en is het supernatant overgebracht in een Eppendorf-cup. De saxitoxine concentraties werden in 5x maal verdunde monsters bepaald met behulp van een ELISA (Abraxis, Saxitoxin PSP ELISA Microtiter Plate, Product No. 522011).

Alle ELISA platen zijn afgelezen met behulp van een Multiscan Spectrum (v 1.0) plate-reader en de data zijn verwerkt volgens de standaard procedure, zoals omschreven in de ELISA handleidingen.

Resultaten

Het aangeleverde materiaal uit de drijfslag bestond voornamelijk uit de cyanobacterie *Microcystis*, maar er werden ook vlokken *Aphanizomenon flos-aquae* aangetroffen (Figuur 2A). Het oudere materiaal uit de bak na ruimen, bevatte veel *Microcystis* met overduidelijke sporen van afbraak van de cellen (Figuur 2B).



Figuur 2: Microscopische opname van vers drijfslagmateriaal (linker paneel A) en geruimd materiaal (rechter paneel B).

Het drooggewicht van het verse materiaal was $40.8 (\pm 2.1) \text{ mg ml}^{-1}$, terwijl dat van het geruimde materiaal significant lager was (*t*-test: $t = 2.3$; $p = 0.05$) met $35.3 (\pm 4.9) \text{ mg ml}^{-1}$. In beide partijen werd een zeer hoge concentratie microcystine gemeten, echter geen saxitoxines en alleen in het verse materiaal een spootje van cylindrospermopsine (Tabel 1).

Tabel 1: Concentraties microcystine (MC), saxitoxine (STX) en cylindrospermopsine (CYL) (in $\mu\text{g g}^{-1}$ materiaal en $\mu\text{g l}^{-1}$) in vers drijfslagmateriaal en geruimd materiaal uit Almere-Haven. Het getal tussen haakjes geeft de standaard deviatie ($n = 5$).

	Cyanotoxines per drooggewicht ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	MC	STX	CYL
Vers drijfslag	96 (27)	--- ND	0.05 (0.05)
Geruimd materiaal	80 (15)	--- ND	--- ND
	Cyanotoxines per volume ($\mu\text{g l}^{-1}$)		
	MC ($\mu\text{g l}^{-1}$)	STX	CYL
Vers drijfslag	3875 (925)	--- ND	3.7 (0.2)
Geruimd materiaal	2817 (666)	--- ND	--- ND

---ND geeft aan dat de waardes beneden de detectielimiet van de ELISA zijn.
 Detectielimiet STX = $0.015 \mu\text{g l}^{-1}$, detectielimiet CYL = $0.040 \mu\text{g l}^{-1}$.

Conclusie

Het aangeleverde materiaal bevatte zeer hoge concentraties microcystines. De gemeten microcystine concentraties geven een 140 – 190 x overschrijding van de zwemwaterrichtlijn en 2800 – 3800 x de drinkwaternorm. De gemeten concentraties leveren bij inname/inhaleren van het materiaal een hoog risico voor de gezondheid.