



Ron van der Oost, Waternet
Annie Kreike, Waterproef

Monitoring van microcystine bij de risicoanalyse van giftige blauwalgen in zwemwater

Omdat veel blauwalgen giftige cyanotoxines, zoals microcystine, kunnen produceren, kan een verhoogde concentratie in oppervlaktewater problemen veroorzaken voor mens en milieu. In het protocol van de Commissie Integraal Waterbeheer¹⁾, dat de meeste Nederlandse waterkwaliteitsbeheerders hanteren, is een raamwerk beschreven voor de monitoring van cyanotoxines. Het was echter niet duidelijk wat de beste manier is om binnen de grenzen van dit raamwerk de risico's voor de zwemmers te bepalen. Daarom hebben Waternet en Waterproef in opdracht van STOWA een onderzoek uitgevoerd om te komen tot een optimale monitoring van microcystine. Het doel was om ondubbelzinnige methoden te beschrijven voor de monsterneming, extractie en analyse, waarbij rekening wordt gehouden met zowel de veiligheid van de zwemmers als de economische belangen. In het nieuwe blauwalgenprotocol van de werkgroep Cyanobacteriën wordt echter voorgesteld om de risico's van blauwalgen te bepalen aan de hand van cellellingen. Het is daarom de vraag of de microcystine-analyse nog wel toekomst heeft.

Cyanobacteriën (ook blauwalgen genoemd) komen het hele jaar voor in het water, met doorgaans een piek in de (na)zomer. Een combinatie van temperatuur, licht en voedingsstoffen (vooral stikstof en fosfaten) kan aanleiding geven tot een massale groei. In een stabiele waterkolom kunnen drijfvlagen ontstaan van zeer hoge concentraties cyanobacteriën. Omdat van veel cyanobacteriën bekend is dat ze zeer giftige stoffen (cyanotoxines) kunnen produceren, kan een hoog gehalte aan cyanobacteriën problemen veroorzaken voor mens en milieu²⁾. Er zijn verschillende soorten cyanotoxines bekend, maar tot enkele jaren geleden werden in Nederland vooral de zogeheten microcystines gevonden³⁾. Om de mens te beschermen tegen de gevaren van cyanotoxines, heeft de VN-wereldgezondheidsorganisatie WHO⁴⁾ richtlijnen gegeven voor de maximale gehalten aan microcystines in drinkwater (1 µg/l) en zwemwater (20 µg/l). Het werd echter aan de beleidsmakers, onderzoekers en laboratoria overgelaten welke procedures moeten worden gebruikt bij de bemonstering, de monstervoorbewerking en de analyse.

In de literatuur was geen eenduidig protocol voorhanden dat voldoet aan de

volgende voorwaarden: de gezondheid van de mens moet worden beschermd (vals-negatieve resultaten zijn ongewenst) én het economische belang moet worden gerespecteerd (vals-positieve resultaten zijn ongewenst).

Het uiteindelijke doel van dit onderzoek was om een procedure voor de microcystine-analyse te vinden die zoveel mogelijk aan de beide voorwaarden voldoet⁵⁾. Bij betrouwbare resultaten van de cyanotoxinemonitoring zullen de adviezen die naar aanleiding van deze analyses worden gegeven, gerespecteerd worden door zowel zwemmers als exploitanten.

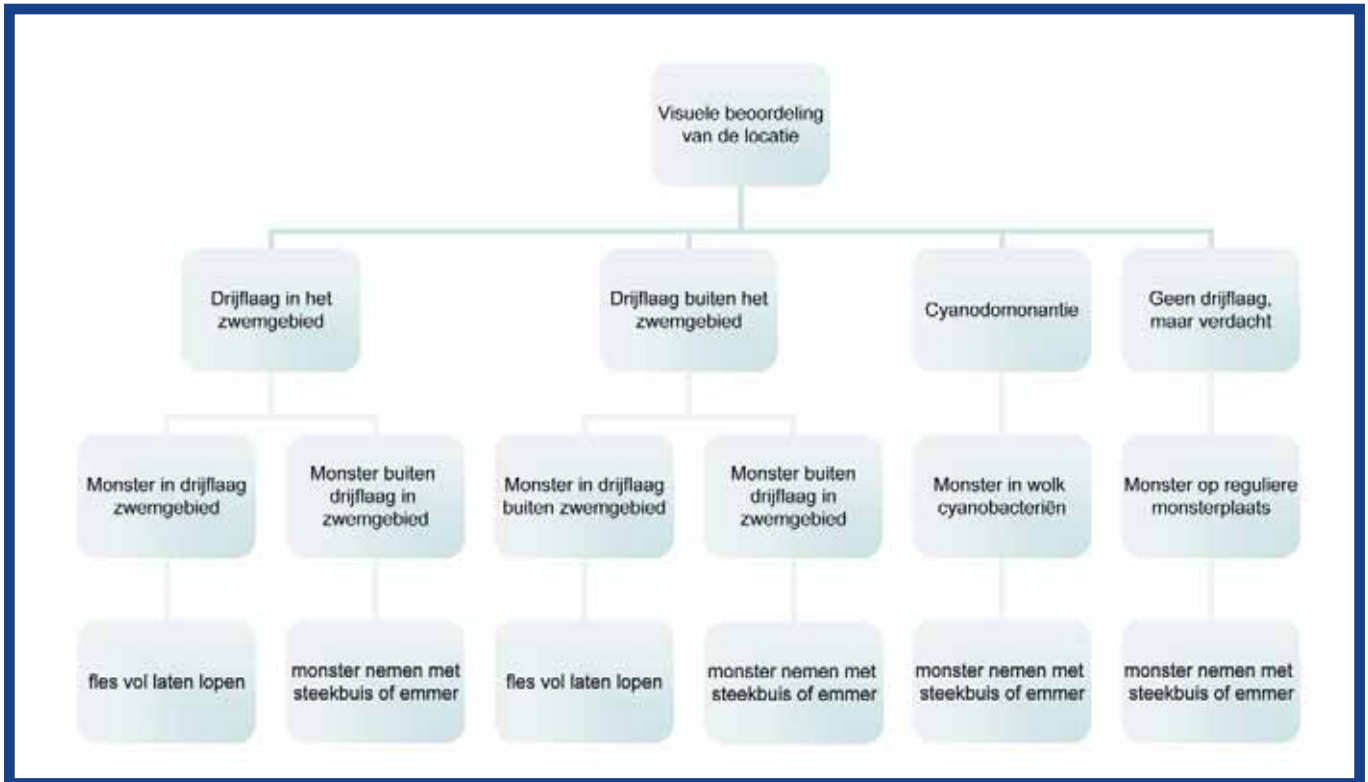
Bemonstering van blauwalgen

De werkgroep Cyanobacteriën heeft richtlijnen opgesteld voor de bemonstering van oppervlaktewater met cyanobacteriën. In dit protocol worden vier situaties onderscheiden die visueel kunnen worden waargenomen: drijfslag binnen de zwemzone, drijfslag buiten de zwemzone, cyanodominantie of verdachte locatie zonder visuele indicatie (zie schema). Voor elke situatie wordt de strategie (waar en hoeveel monsters nemen) en de uitvoering (hoe bemonsteren) beschreven. In 2006 zijn de ervaringen met het protocol geëvalueerd.

Naar aanleiding van commentaren van belanghebbenden (waterschappen, provincies en Rijkswaterstaat) is het bemonsteringsprotocol aangescherpt en op enkele punten duidelijker gemaakt. In de definitieve versie is ook een interpretatie van de analysegegevens opgenomen (zie www.stowa.nl).

Selectie van snelle en simpele extractiemethode

In het CIW-protocol zijn naast de tijdrovende Fastner-extractie drie snelle methoden aangegeven om monsters van oppervlaktewater te extraheren: met een ultrasoon probe (één minuut), met een kokend waterbad (één minuut) en met een magnetron (negen minuten). Daarnaast wordt ook de methode van herhaald invriezen en ontdooien gebruikt. In de literatuur worden wel snelle extractiemethoden beschreven⁶⁾, maar een goede vergelijking van het rendement en de reproduceerbaarheid van de bovenvermelde methoden ontbreekt. Op het laboratorium van Waterproef is een onderzoek uitgevoerd naar de betrouwbaarheid van verschillende snelle en simpele extractiemethoden: trillen met ultrasoon probe, koken in waterbad, verwarming met magnetron en herhaald invriezen en ontdooien. De methoden werden alle vergeleken met de betrouwbare maar tijdrovende methanol extractie



Afb. 1: Stroomschema voor de bemonstering van blauwalgen.

volgens Fastner *et al*⁷⁾. Het onderzoek werd uitgevoerd in vier monsters met verschillende hoeveelheden en soorten cyanobacteriën. Op grond van het criterium dat de methode betrouwbaar (hoog rendement en goede reproduceerbaarheid), snel en simpel moet zijn, werd geconcludeerd dat koken in een waterbad gemiddeld de beste resultaten gaf (afbeeldingen 2 en 3).

Optimalisatie van de extractiemethode

Hoewel door Metcalf en Codd⁶⁾ een kooktijd van één minuut als voldoende werd aangegeven, lijkt het niet zinvol om deze korte kooktijd aan te houden met een monstervolume van twee milliliter. Het monster zal namelijk enkele minuten nodig hebben om op te warmen in het waterbad. Daarnaast bleek uit het onderzoek dat de reproduceerbaarheid van een celextractie met tien minuten koken onvoldoende was.

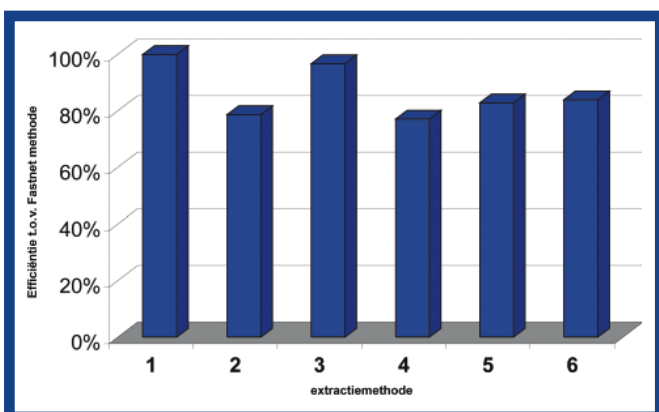
Op grond van de onderzoeksresultaten lijkt een kooktijd van 30 minuten optimaal. Een verdere verlenging van de kooktijd (40 en 60 minuten) bleek geen duidelijke invloed op de kwaliteit van deze extractie te hebben.

De resultaten van microcystine-analyse kunnen worden beïnvloed door binding van de stof aan de plastic onderdelen (bewaaruvaatjes, pipetpuntjes, injectiespuiten, etc.), waarmee ze tijdens de extractie in contact komen. Deze binding kan worden voorkomen door toevoeging van methanol. Maar omdat de ELISA-analyse (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) van microcystine door methanol kan worden verstoord, werd daarvan echter bij voorkeur geen gebruik gemaakt. De ELISA-analyse is zo gevoelig dat bij microcystinegehalten boven 1,6 µg/l een verdunning van het extract moet worden gemaakt. Monsters met gehalten rond de

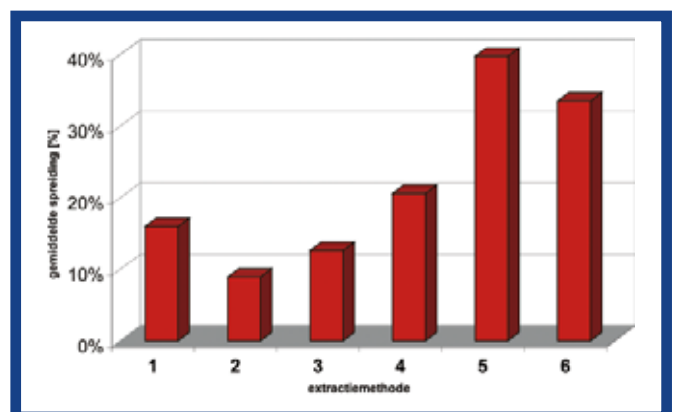
zwemwaternormen (10 en 20 µg/l) zullen dus altijd moeten worden verdund.

Daarom is het mogelijk om de celextractie uit te voeren bij hoge methanolconcentraties, waarna het gefiltreerde extract voor de ELISA-analyse zodanig met demiwater wordt verdund dat het methanolgehalte in het eindextract onder de kritische grens van vijf procent ligt. Uit het onderzoek bleek dat toevoeging van 50 procent methanol aan het monster een positieve invloed had op het rendement en de reproduceerbaarheid van de extractie. De methanoltoevoeging kan niet worden toegepast als de monsters onverdund worden geanalyseerd, bijvoorbeeld voor een toetsing aan de drinkwaternorm van één µg/l. Omdat in eerste aanleg werd verondersteld dat de ELISA-analyse moest worden uitgevoerd met heldere extracten, werden de ruwe extracten gecentrifugeerd en gefiltreerd. Uit nader onderzoek bleek echter dat deze stappen niet nodig

Afb. 2: Gemiddelde extractie rendementen van vijf verschillende snelle methoden ten opzichte van de bewerkelijke Fastner MeOH extractie (1): ultrasoon probe (2), kokend waterbad (3), magnetron (4), vries/dooi met ultrasoonbad (5) en vries/dooi met blender (6).



Afb. 3: Gemiddelde reproduceerbaarheid (% standaard deviatie) van de bewerkelijke Fastner MeOH extractie (1) en vijf verschillende snelle methoden: ultrasoon probe (2), kokend waterbad (3), magnetron (4), vries/dooi met ultrasoonbad (5) en vries/dooi met blender (6).



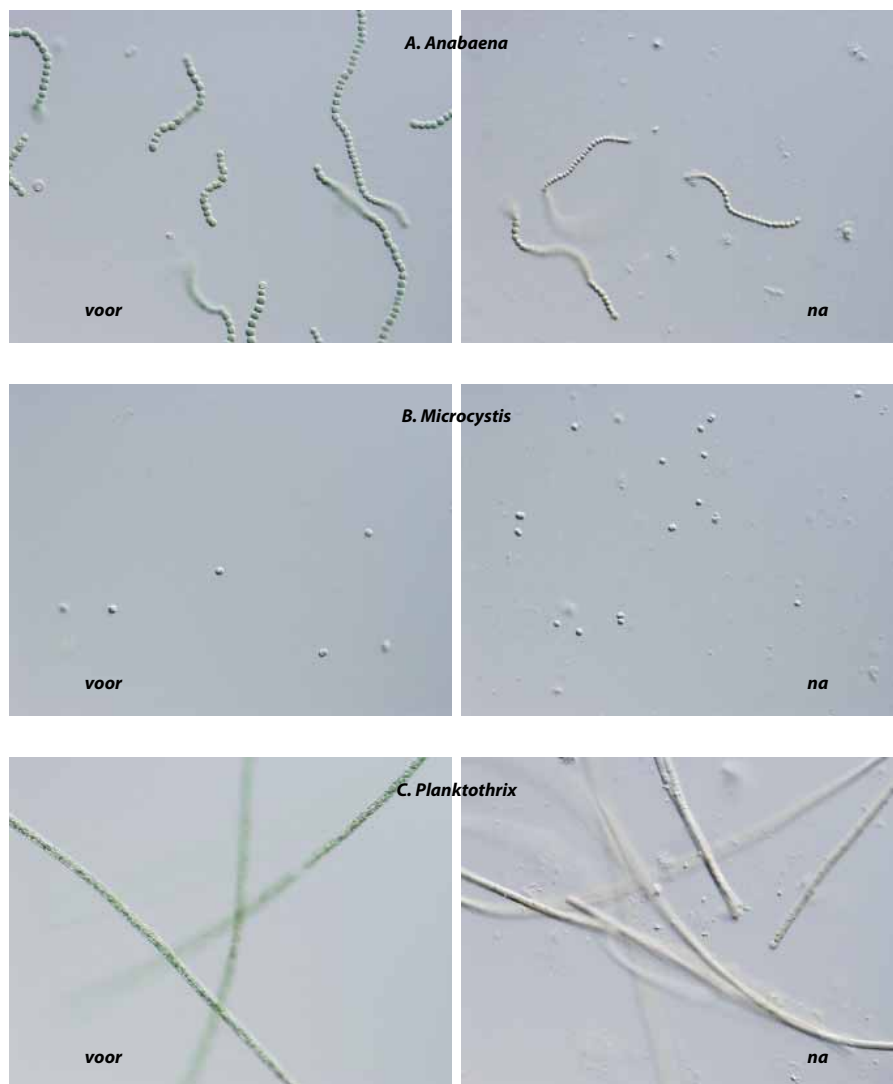
zijn, zodat het extractieprotocol nog simpeler kon worden gemaakt. Het is voor de reproduceerbaarheid echter wel nodig om het ruwe extract voor de ELISA-analyse zeer goed te homogeniseren (zie www.stowa.nl).

Vergelijking ELISA- en HPLC-analyse

Omdat de HPLC-analyse minder gevoelig is dan de ELISA-analyse, moet er altijd een concentrering van de cellen in het water plaatsvinden door middel van filtratie. Met deze procedure wordt dus alleen het intracellulaire microcystine (aanwezig in de cellen) geëxtraheerd en wordt het extracellulaire microcystine (aanwezig in de waterfase) niet bepaald. Uit de resultaten van het in dit rapport beschreven onderzoek blijkt echter dat het extracellulaire microcystinegehalte in sommige gevallen zeer hoog kan zijn (ruim 95 procent). Er is een afgeleid extractieprotocol gemaakt dat ook voor HPLC-analyses gebruikt zou kunnen worden. Voor monsters met lage gehalten aan cyanobacteriën lijkt het protocol waarbij het filter met cellen een half uur gekookt wordt in 50 procent methanol, goed te werken. Bij hogere celconcentraties wordt het microcystine echter niet volledig van het filter geëxtraheerd en is de methode dus ongeschikt. De met HPLC bepaalde MC-gehalten op de filters waren in alle gevallen lager dan de met ELISA bepaalde gehalten. Dit kan enerzijds worden verklaard met het feit dat bij de HPLC-analyse slechts twee van de circa 60 microcystines werden geanalyseerd (RR-MC en LR-MC), terwijl met de ELISA-analyse meerdere microcystines kunnen worden aangetoond. In de HPLC-chromatogrammen werden ook onbekende componenten gevonden die op grond van hun UV-spectrum leken op microcystines, maar die niet konden worden gekwantificeerd. Daarnaast is het mogelijk dat bij de extra extractiestappen (indampen en filtreren van het extract) die voor de HPLC-analyse nodig waren microcystines verloren zijn gegaan.

Kwaliteit van de microcystine-analyses

De betrouwbaarheid van de resultaten van dit onderzoek is voor een groot deel afhankelijk van een goede kwaliteit van de uitgevoerde microcystine-analyses. De analyses werden alle uitgevoerd met de ELISA-methode. Om individuele verschillen te voorkomen, zijn alle analyses uitgevoerd door dezelfde persoon op het laboratorium van Waterproef. Dit laboratorium heeft vanaf 2005 jaarlijks meegedaan met een internationaal ringonderzoek, georganiseerd door Juan Ribo (Universiteit van Catalonië, Spanje). De resultaten van deze ringtesten waren zeer bevredigend: kleine afwijking van de gemiddelde gehalten van alle laboratoria, goede reproduceerbaarheid en goede herhaalbaarheid. Omdat de kwaliteit van de ELISA-analyse met de *SDI Enviroguard kit* sterk kan variëren, was het nodig om een interne kwaliteitscontrole uit te voeren met een referentie monster. De HPLC-analyses werden uitgevoerd volgens de interne kwaliteitsprotocollen op het Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteem Dynamica van de Universiteit van Amsterdam. De kwaliteitsborging van de analyses was voldoende



Afb. 4: Microscopisch onderzoek van drie soorten cyanobacteriën, A. Anabaena, B. Microcystis en C. Planktothrix (gekweekt op de Universiteit van Amsterdam) voor en na de extractie met 50% methanol in kokend water. Vergroting 400x (foto's: Annie Kreike).

om de conclusies van dit onderzoek als betrouwbaar te kwalificeren.

Microscopisch onderzoek

Bij de vergelijking tussen vijf snelle extractiemethoden werd uitsluitend gekeken naar het rendement (de opbrengst van microcystine) en de reproduceerbaarheid van de extractie. Er werd niet onderzocht of de cyanobacteriën tijdens de extractie daadwerkelijk kapot werden gemaakt. Uit een microscopisch onderzoek bleek dat bij geen van de onderzochte soorten cyanobacteriën (*Anabaena*, *Microcystis* en *Planktothrix*) de cellen kapot gingen tijdens de extractie in een kokend waterbad, omdat de aantallen hele cellen voor en na de extractie niet duidelijk verschilden (zie foto's). Bij *Anabaena* en *Microcystis* werd na de extractie wel een meetbare afname van de celdiameter waargenomen, waaruit bleek dat een deel van de celinhoud werd uitgescheiden. Bij *Planktothrix* werd geen afname van de celdiameter aangetoond. Uit de microcystine-analyses bleek dat de extractie geen effect had bij *Anabaena*, omdat het microcystinegehalte voor en na de extractie nauwelijks meetbaar was. Bij *Microcystis* werd echter een grote hoeveelheid microcystine aangetoond na de behandeling met

methanol in kokend waterbad, terwijl voor het koken vrijwel geen microcystine werd gevonden. Bij *Planktothrix* blijkt het microcystinegehalte ook zonder de behandeling in een kokend waterbad al hoog te zijn. Er is aangetoond dat microcystine zowel in laboratoriumkweken als in veldmonsters met *Planktothrix* dominantie ook zonder koken al extracellulair aanwezig is. Omdat uit de literatuur bekend is dat cyanotoxines goed uit *Planktothrix* kunnen worden geëxtraheerd met polaire oplossingen (zowel methanol als water), lijkt de celwand van deze soort goed doorlaatbaar voor microcystine.

Ringtest 2006

De resultaten van de ringtestmonsters die met de aanbevolen methode werden geëxtraheerd, bleken het best overeen te komen bij de monsters van een kweek met *Microcystis* en een veldmonster met *Microcystis*-dominantie (respectievelijk monster A en C in de tabel hiernaast). De relatieve variatie was bij deze monsters minder dan 30 procent. De interlaboratorium variatie was groter bij de monsters van een *Planktothrix*-kweek en een veldmonster met *Anabaena*-dominantie. Op grond van een statistische classificatie met zogeheten Z-scores van de gemiddelde

waarden per laboratorium bleek slechts één resultaat van twijfelachtige kwaliteit. Hierbij moet echter worden aangetekend dat de individuele resultaten van één van de laboratoria een zeer grote spreiding vertoonden, maar dat de gemiddelde waarden hiervan nog net een acceptabele Z-score haalden. De verschillen tussen de microcystineresultaten na extractie met de aanbevolen methode en de resultaten met de eigen extractiemethoden van enkele laboratoria waren niet groot. De monsters voor de ringtest moesten worden ingevroren voordat ze naar de laboratoria werden verstuurd. Door het invriezen was een groot deel van de cellen beschadigd, zodat de meerderheid van de microcystines al extracellulair in het monster aanwezig was. Hoewel het logistiek veel lastiger is, lijkt het nuttig om in het vervolg een ringtest uit te voeren met verse monsters. Een aantal laboratoria heeft ook deelgenomen aan een internationale ringtest, georganiseerd door Juan Ribo van de Universiteit van Catalonië, waarin de reproduceerbaarheid van de microcystine-analyse is onderzocht. Ook de resultaten van deze ringtest waren bevredigend.

Conclusies

- Een snelle extractie van blauwalgen in een kokend waterbad blijkt een betrouwbare methode om microcystines te analyseren in monsters met een *Microcystis*- en *Planktothrix*-dominantie. Deze methode is echter ongeschikt voor monsters met *Anabaena*-dominantie. Ook de overige onderzochte snelle extractie-methoden, zoals vries-dooi, magnetron en ultrasoon, waren voor *Anabaena* minder efficiënt dan de bewerkelijke Fastner-methode. Doordat de extractie-efficiëntie sterk kan variëren voor de verschillende algensoorten, is het belangrijk om bij alle gevallen van algenbloei een monster te onderzoeken op de globale soortensamenstelling;
- Bij optimalisering van de extractie bleek dat een kooktijd van 30 minuten optimaal is, toevoeging van 50 procent methanol tijdens het koken het rendement van de extractie verhoogt en dat nabehandelingen om het extract helder te maken (centrifugeren en filtreren) niet nodig zijn voor de ELISA-analyse;

- De blauwalgencellen worden tijdens de extractie niet vernietigd, maar het microcystine wordt bij de algensoorten *Microcystis* en *Planktothrix* wel uit de cellen geëxtraheerd.

Aanbevelingen

Het in dit onderzoek ontworpen extractie-protocol is alleen betrouwbaar voor monsters met *Microcystis*- en *Planktothrix*-dominantie. Het is daarom van groot belang dat de globale soortensamenstelling in milieumonsters wordt bepaald, omdat het extractie-afhankelijk is van de algensoort. Bij elk geval van algenbloei zal dus microscopisch onderzoek moeten worden uitgevoerd om de dominante soorten te bepalen. Bij *Microcystis*- en *Planktothrix*-dominantie kunnen de risico's voor de zwemmer worden geschat met een microcystine-analyse na extractie volgens het geoptimaliseerde extractieprotocol. De risico's voor zwemmers in water waarin *Anabaena* dominant is, kunnen worden bepaald op grond van het aantal cellen per milliliter. Volgens het WHO-rapport van Chorus en Bartram⁵⁾ is een dichtheid van 100.000 cellen per milliliter de richtlijn voor een verhoogd alarm vanwege de grotere kans op nadelige effecten en de mogelijke vorming van drijfslagen. Omdat steeds vaker *Anabaena*- en andere blauwalgensoorten worden waargenomen die naast microcystine ook andere cyanotoxines vormen (bijvoorbeeld anatoxine), zullen de risico's voor de zwemmers in de toekomst meer op celaantallen dan op toxinegehalten worden beoordeeld. Het door de Cyanowerkgroep voorgestelde nieuwe blauwalgenprotocol, dat waarschijnlijk in de loop van volgend jaar van kracht wordt, is hierop gebaseerd. De microcystine-analyse kan naast dit protocol optioneel worden toegepast bij een dominantie van *Microcystis* of *Planktothrix*, maar zal geen integraal onderdeel meer uitmaken van de risicoanalyse.

LITERATUUR

- 1) Commissie Integraal Waterbeheer (2002). Veilig zwemmen: cyanobacteriën in zwemwater. Aangepast protocol 2002.
- 2) Gezondheidsraad (2001). Microbiële risico's van zwemmen in de natuur. Gezondheidsraad. Publicatienummer 2001-/25.

- 3) Wolfstein K. en M. Roukema (2002). Blauwalgen, cyanobacteriën. Brochure DG Rijkswaterstaat.
- 4) WHO (1999). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.
- 5) Van der Oost R. (2009). Cyanotoxin monitoring: standaardisering en validatie van methoden voor de Nederlandse Waterkwaliteitsbeheerders. STOWA. In voorbereiding.
- 6) Metcalf J. en G. Codd (2000). Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *Fems Microbiology Letters* 184: pag. 241-246.
- 7) Fastner J., I. Flieger en U. Neumann (1998). Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32, pag. 3177-3181.

Gemiddelde resultaten microcystine-extractie en -analyse ringtest 2006.

	monster A MC (µg/l)	monster B MC (µg/l)	monster C MC (µg/l)	monster D MC (µg/l)
lab 1	1080	1220	3,2	0,72
lab 2	997	2187	6,4	4,70
lab 3	1006	381	3,7	1,40
lab 4	1080	1118	4,3	2,03
lab 5	1586	2540	4,5	0,44
lab 6	1035	1280	3,9	1,30
lab 7	1063	1327	2,4	1,23
lab 8	1832	905	8,0	1,62
gemiddeld	1210	1370	4,6	1,68
standaardafwijking	317	689	1,8	1,32
%	26%	50%	40%	78%