



Ministerie van Verkeer en Waterstaat
Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

RIZA Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling

Ecologische effecten van cyanotoxines in het IJsselmeer

RIZA rapport 2004.010

Dit rapport is te bestellen à € 12,50 per stuk bij Cabri Mailservice, Postbus 431, 8200 AK Lelystad,
Tel. 0320-285333, Fax. 0320-285311, E-mail riza@cabri.nl
Betaling na levering; een acceptgiro wordt bijgevoegd.
Het rapport is gratis voor dienstonderdelen van het Ministerie van Verkeer en Waterstaat.

This publication can be ordered at € 12,50 per copy through Cabri Mailservice, PO Box 431,
8200 AK Lelystad, The Netherlands, Tel. +31 320 285333, Fax, +31 320 285311, E-mail riza@cabri.nl
Payment on delivery.



Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat

RIZA Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling

Ecologische effecten van cyanotoxines in het IJsselmeer

Resultaten uit monitoring en experimenten

RIZA rapport 2004.010

ISBN 90 369 56307

Auteurs: K. Wolfstein (RIZA-WSE)

J. de Jonge (RIZA-WSE)

K. Bruning (AquaSense)

B.W. Ibelings (NIOO-CL)

RIZA

Lelystad, juni 2004

Inhoudsopgave

Samenvatting 5

1 Inleiding 9

2 Materiaal en methoden 11

- 2.1 Monsterlocaties monitoring 11
- 2.2 Monsternamen en analyses 11
 - 2.2.1 Monsternamen 11
 - 2.2.2 Analyses uitgevoerd door AquaSense 11
 - 2.2.3 Analyses uitgevoerd door het NIOO-CL 12
 - 2.2.3.1 Opzet graasproeven 12
 - 2.2.3.2 Opzet accumulatieproeven 12
 - 2.2.3.3 Opzet "life-history"proeven 13
 - 2.2.3.4 Methode-check microcystine analyse 14

3 Resultaten 17

- 3.1 Graas op (toxische) cyanobacteriën 17
 - 3.1.1 Begrazing van IJsselmeer-seston door *Daphnia* 17
 - 3.1.2 Begrazing van IJsselmeer-seston door *Dreissena* 20
 - 3.1.3 Vergelijking graasgedrag *Daphnia* en *Dreissena* 21
- 3.2 Concentratie van microcystine in de voedselketen 22
 - 3.2.1 Samenstelling en microcystine gehalten in het seston van het IJsselmeer 22
 - 3.2.2 Microcystine in zoöplankton en mosselen 25
 - 3.2.3 Microcystine in IJsselmeer-vis 25
- 3.3 Accumulatie en bioaccumulatie 28
- 3.4 Effecten van cyanobacteriën & toxines op *Daphnia*, *Dreissena* en vis 32
 - 3.4.1 Groei en reproductie van *Daphnia* bij natuurlijke & experimentele voedselcondities 32
 - 3.4.1.1 Groei 32
 - 3.4.1.2 Ei-productie 33
 - 3.4.1.3 Mortaliteit 35
 - 3.4.2 Mortaliteit bij *Dreissena* 36
 - 3.4.3 Effecten van microcystines op vis 37
 - 3.4.3.1 Histologische leverafwijkingen in het veld 37
 - 3.4.3.2 Gevoeligheid van Baars voor geïnjecteerde microcystine 38
 - 3.4.3.3 Gevoeligheid van Baars voor oraal toegediende microcystine 40
 - 3.4.3.4 Gevoeligheid van Pos voor oraal toegediende microcystine 43
- 3.5 Methodiek 45

4 Discussie en conclusie 47

- 4.1 Wat betekenen de resultaten voor het ecosysteem? 47
 - 4.1.1 Betrouwbaarheid van de methodiek 47
 - 4.1.2 Voorkomen van cyanotoxines in het IJsselmeer 47
 - 4.1.3 Relevantie voor zoöplankton 48
 - 4.1.4 Relevantie voor mosselen 48
 - 4.1.5 Relevantie voor vis 49
 - 4.1.6 Relevantie voor vogels 49
- 4.2 Hoe erg zijn de effecten uiteindelijk? 50
 - 4.2.1 Betekenis voor vogelsterfte (Volkerak-Zoommeer en Oostvaardersplassen) 51

5 Literatuur 53

Samenvatting

- *Cyanotoxines zitten overal in de voedselketen.*
- *Er vindt geen bioaccumulatie of biomagnificatie plaats.*
- *Effecten op zoöplankton lijkt aannemelijk.*
- *Er zijn geen aanwijzingen voor effecten op mosselen.*
- *Cyanotoxines hebben subletale effecten op vissen; het is mogelijk één van de oorzaken van massale sterfte, maar niet de hoofdoorzaak.*
- *Leverschade bij vogels door cyanotoxines is aannemelijk; er zijn aanwijzingen dat anatoxine een rol speelt bij massale vogelsterfte.*
- *Er zijn een 12-tal microcystines in het IJsselmeer aangetroffen; het meest bekende en zeer toxische MC-LR kwam nauwelijks voor.*
- *Kennis over indentiteit en toxiciteit van toxines in het nederlandse oppervlaktewater is nodig om een realistische schatting van de risico's te kunnen maken.*
- *Een betrouwbare analysemethode voor anatoxines is nodig om de rol in de massale vogelsterfte beter te kunnen bepalen.*
- *Het is aan te bevelen de chromatograaf/massaspectrometer te gebruiken voor de analyse van toxines in organismen en weefsel.*

Aanleiding onderzoek

Het gelijktijdig optreden van massale vissterfte en boei van cyanobacteriën (blauwalgen of –wieren) in 1994 riep bij de beheerder van het IJsselmeer de vraag op of er een samenhang tussen beide observaties bestaat. Uit een eerste literatuurstudie naar deze samenhang en een worst-case berekening voor enkele Nederlandse watersystemen, bleek dat de cyanotoxines (gifstoffen) die geproduceerd worden door cyanobacteriën een risico vormen voor hogere trofische niveaus. Weinig was echter bekend over de concentraties van cyanotoxines in organismen in het Nederlandse oppervlaktewater en de daadwerkelijke effecten. Daarom werd van 1996 t/m 2003 een meerjarig veld- en laboratoriumonderzoek opgezet naar het voorkomen en de risico's van cyanotoxines in het voedselweb in het IJsselmeer. Het onderzoek is uitgevoerd in opdracht van Rijkswaterstaat – Directie IJsselmeergebied en het Hoofdkantoor van Rijkswaterstaat.

Cyanotoxines in de voedselketen

Het aandeel cyanobacteriën in het fytoplankton in het IJsselmeer neemt in de loop van het seizoen toe tot 75 à 90% in september. Gemiddeld bestaat 35% uit potentieel toxische cyanobacteriën, met uitschieters tot 90%. Ze behoren tot de geslachten *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* en *Coelosphaerium*. Van de potentieel aanwezige toxines zijn alleen de microcystines gemeten. In bijna alle monsters werd een wisselend aantal van 1-12 verschillende microcystinetypes gevonden.

Cyanotoxines zitten in cyanobacteriën en komen via predatie in de voedselketen terecht. Er zijn twee belangrijke voedselroutes waardoor cyanotoxines uiteindelijk in vissen en vogels terecht komen: de één heeft zoöplankton (o.a. watervlooien) als basis, de andere mosselen. Beide routes zijn nader verkend door te kijken naar toxineconcentraties in organismen in het veld, naar accumulatie in de voedselketen en naar effecten van toxines op de organismen onder veldcondities en in experimentele situaties.

Het blijkt dat microcystines in alle trofieniveau's (zoöplankton, mosselen, vissen en vogels) terecht komen: 80% van de zoöplanktonmonsters, 90%

van de mossel-monsters en 100% van de vislever-monsters bevatten microcystine. Er lijkt echter geen bioaccumulatie (concentratietoename door ophoping in een organisme) of biomagnificatie (concentratietoename door doorgifte in de voedselketen) op te treden: de microcystinegehalten in de hogere trofieniveau's zijn lager dan in het fytoplankton.

Effecten op zoöplankton

De concentraties microcystine in het zoöplankton in het IJsselmeer blijken bijna steeds op een potentieel schadelijk niveau te zitten, als dit wordt vergeleken met effectgegevens uit literatuur voor filtratiesnelheid, reproductie en overleving van zoöplankton. Het schadelijk effect is ook afhankelijk van de stam van *Microcystis* waarmee het zoöplankton in aanraking komt. Life history proeven met *Daphnia* (watervlooien) laten zien dat de sterk toxische *Microcystis* stam PCC7820 in een hoge dosis dodelijk was voor *Daphnia*, zelfs indien deze voldoende hoogwaardig groenwielvoedsel kreeg. Hoge doses groenwieren beschermden wel tegen een lage dosis PCC7820. De laag toxische *Microcystis* stam CYA143 had niet zulke duidelijke effecten. Een goede conditie van *Daphnia* blijkt eveneens een rol te spelen in het minder gevoelig zijn voor toxische cyanobacteriën. Cyanobacteriën in natuurlijk seston uit het IJsselmeer zijn in het algemeen minder toxisch dan toxische *Microcystis* stam PCC7820, alhoewel incidenteel stammen lijken voor te komen met eenzelfde hoge toxiciteit. De conditie van *Daphnia* is echter niet optimaal in het IJsselmeer. Een en ander maakt het aannemelijk dat er schadelijke effecten van microcystine op *Daphnia* in het IJsselmeer zijn.

Effecten op mosselen

Adulte mosselen (*Dreissena*) gevoerd met sterk toxische *Microcystis* leidden niet tot een verhoogde mortaliteit. Wel werd er een negatief effect gevonden op het graasgedrag en sterfte van larven bij toxische *Microcystis* als voedsel vergeleken met niet-toxische *Microcystis*. Ook uit literatuur blijkt dat mosselen niet erg gevoelig zijn voor toxines; mogelijk komt dit doordat ongewenste voedseldeeltjes uit gescheiden worden als pseudofaeces. In dit onderzoek kon dit echter niet worden aangetoond.

Effecten op vissen

Bij de waargenomen microcystineniveaus in het zoöplankton zijn op basis van de literatuur intoxicaties te verwachten voor planktivore vissen. In alle levers van *Baars*, *Pos* en *Spiering* uit het IJsselmeer is microcystine aangetroffen. Het microcystinegehalte vertoonde een relatie met de voedselkeuze van de vis: spiering (zoöplankton-eter) bevatte significant hogere concentraties aan microcystines dan *Pos* (eter van vlokreeften en muggenlarven) en *Baars* (eter van zoöplankton en visjes).

De levers van IJsselmeervis vertoonden degeneratie en ontsteking van levercellen. Dit is mogelijk het gevolg van van cyanotoxines, maar het kan ook andere oorzaken hebben. Er bestond geen duidelijk verband tussen de leverschade in vis en het microcystinegehalte van de levers.

De wijze van blootstelling speelt een belangrijke rol in de giftigheid van microcystine. Experimenten met baars, die via injectie in de buikholte blootgesteld werd aan microcystine, leidden in veel gevallen tot aan de dosis gerelateerde leverschade en tot sterfte. De LD₅₀ bedroeg 1008 µg MC per kg lichaamsgewicht. Chronische blootstelling aan microcystine via het voedsel, zoals dat in het IJsselmeer optreedt, leidde niet tot vissterfte (wel tot herkenbare leverschade).

Het lijkt erop dat microcystines schadelijke maar subletale effecten hebben op vis in het IJsselmeer. Hierbij gaat het met name om planktivore vis. Blankvoorn die zich voedt met mosselen wordt door het lage microcystine

gehalte in de mosselen aan veel lagere concentraties blootgesteld. Vissterfte in het IJsselmeer gedurende een zomerbloei van cyanobacteriën lijkt verklaard te kunnen worden door het simultaan optreden van meerdere stressfactoren (hoge temperatuur, hoge pH, laag O₂) waarbij microcystine een bijdrage levert.

Effecten op vogels

Er is een schatting gemaakt van het voor Aalscholvers kritische microcystinegehalte in de levers van vis van 75 µg microcystine /gr vislever AFDW. De levers van Baars en de meeste levers van Pos hebben microcystinegehalten onder dit niveau. De microcystinegehalten van de levers van Spiering liggen hier echter merendeels boven, tot maximaal een factor 12. Gebaseerd op de gemeten concentraties in Spiering, en gelet op de resultaten uit het laboratoriumonderzoek en berekeningen in de literatuur, is sterfte van visetende vogels niet waarschijnlijk, maar wel het optreden van leverschade. Microcystine die is opgenomen door bijvoorbeeld *Dreissena* verdwijnt vrij snel weer uit het weefsel. Dit betekent dat duikeenden die in de winter foerageren op mosselen niet aan microcystines worden blootgesteld. In 2002 en 2003 zijn massale vogelsterftes opgetreden in het Volkerak-Zoommeer (circa 5000) en de Oostvaardersplassen (circa 10.000), die geassocieerd worden met cyanotoxines. De verlamingsverschijnselen die de vogels in de Oostvaardersplassen toonden kan een gevolg zijn van een vergiftiging door anatoxine. Anatoxine is een neurotoxine dat op het zenuwstelsel werkt, anders dan microcystine – een hepatotoxine – die op de lever werkt. Uit de literatuur is bekend dat subletale doses microcystine de toxiciteit van anatoxine versterkt. Er zijn helaas geen gegevens van anatoxine uit de Oostvaardersplassen, maar wel was microcystine aanwezig en de cyanobacterie *Anabaena flos-aquae*, die bekend staat om de productie van anatoxine-a. In een nabij gelegen plas, waar ook *Anabaena flos-aquae* was, is wel anatoxine-a geanalyseerd, door een laboratorium in Ierland. Dit is de eerste keer dat in Nederland het gif anatoxine werd aangetoond. Hoewel er dus een sterke aanwijzing is dat anatoxines een rol spelen in de massale vogelsterfte kan een definitief uitsluitsel niet worden gegeven. Het ontwikkelen van een betrouwbare analysemethode is essentieel om de mogelijke relatie tussen de massale vogelsterfte en anatoxines beter te kunnen uitzoeken.

Analysemethoden microcystines en risicoschatting

Er is een 12-tal verschillende microcystines in het IJsselmeer gemeten. Eén van de meest toxische én in de literatuur meest onderzochte variant, microcystine-LR (MC-LR), kwam echter slechts sporadisch voor. Het gebruik van toxiciteitgegevens gebaseerd op MC-LR voor de interpretatie van ecologische effecten en het schatten van risico's van toxines in het IJsselmeer is daardoor onzeker; er kan sprake zijn van een overschatting. Dit geldt ook voor het inschatten van humane risico's, wat verder buiten de scope van dit onderzoek ligt. Het zijn echter de enige toxiciteitgegevens die voorhanden zijn. Aanvullend onderzoek naar de identiteit en toxiciteit van in het IJsselmeer voorkomende microcystines is noodzakelijk om de uitspraken naar waarde te kunnen schatten.

Microcystines oefenen hun toxische werking uit door zich te binden aan eiwitfosfatases. Ze komen in organismen dus voor in een vrije vorm of covalent gebonden aan de fosfatases. In deze studie is aangenomen dat de gemeten pool vrij extraheerbaar (niet gebonden) microcystine een goed beeld geeft van de hoeveelheid potentieel toxische microcystine in het voedselweb.

Ook blijkt uit literatuur dat detoxicatie van microcystines in het weefsel van planten en dieren plaatsvindt. De detoxicatie producten kennen slechts een

fractie van de toxiciteit van het oorspronkelijk toxine. In dit onderzoek is de HPLC-methode als standaard gebruikt voor microcystine analyses. Hierbij wordt echter geen onderscheid gemaakt tussen de oorspronkelijke toxines en detoxicatie conjugaten. Dit kan wel door analyses op de LC-MS. Een parallelle analyse met beide methoden leverde echter geen groot verschil in resultaat op. Vooral nog is er daarom geen reden om aan te nemen dat de analyse van vrij microcystine zoals die in het IJsselmeerproject werd toegepast een sterk vertekend beeld oplevert van microcystine in het voedselweb. Voor toekomstig onderzoek aan microcystines in biota is het gebruik van LC-MS aan te bevelen.

1 Inleiding

De aanleiding voor de opzet van het onderzoeksprogramma waren de vragen:

Bestaat er een samenhang tussen de vissterfte in het IJsselmeer (1995) en cyanobacteriënbloeien?

Wat zijn de risico's van (toxische) cyanobacteriën voor het ecosysteem?

Zijn het eerder primair-acute effecten (vis- en vogelsterfte), of juist secundair-chronische, subletale effecten (verstoring gedrag, groei, voortplanting, voedselweb-relaties)?

Uit een literatuurstudie en een worst-case berekening naar de potentiële effecten van toxische cyanobacteriën op aquatische ecosystemen bleek dat cyanobacteriën of hun toxines mogelijk een risico vormen voor hogere trofische niveaus (AquaSense 1996b). Tot op heden is de specifieke rol van cyanobacteriën en hun toxines in het bijzonder bij de sterfte van vissen en vogels onduidelijk.

Sommige cyanobacteriëngeslachten zoals *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* en *Planktothrix* zijn in staat tot productie van toxines zoals:

- neurotoxines (anatoxine, saxitoxine) die aangrijpen op de overdracht van zenuwpulsen naar de spiervezels;
- hepatotoxines (microcystine, nodularine, cylindrospermopsine) die de eiwitfosfatase in de lever remmen (Chorus & Bartram 1999);

Daarnaast zijn er lipopolysaccharides (LPS) die o.a. voorkomen op de celwand van (cyano)bacteriën en remmend werken op detoxicatie van microcystines (Best *et al.* 2002).

Er zijn meer dan 60 verschillende typen microcystines geïdentificeerd, van wie microcystine-LR als een van de meest toxische typen is beschreven (Chorus & Bartram 1999). Microcystine is vooral intracellulair aanwezig en wordt niet actief uitgescheiden. Om überhaupt effect te hebben moeten microcystines eerst worden opgenomen door het inslikken van water – en fytoplankton, of het eten van fytoplankton door bijvoorbeeld zoöplankton of mosselen. Via deze route kunnen de toxines terecht komen in vissen of vogels. Sommige cyanobacteriën zijn door hun vorm (kolonies of filamenten) en afmeting slecht graasbaar. Indien de cyanobacteriën niet of nauwelijks worden gegeten zal microcystine dus ook niet doordringen in het voedselweb. Naast de bedreiging door cyanotoxines speelt de beschikbaarheid van voldoende voedsel (kwantitatief en kwalitatief) een belangrijke rol voor de groei en conditie van (aquatische) organismen. Daarom werden de effecten van cyanobacteriën (als onderdeel van het voedsel) op hun predatoren – watervlooien en driehoeksmosselen – onderzocht.

Bovendien zijn watervlooien (*Daphnia* spp., zoöplankton) en driehoeksmosselen (*Dreissena polymorpha*, macrofauna) belangrijke filtreerders van fytoplankton en kunnen zij de hoeveelheid en soortensamenstelling van het fytoplankton beïnvloeden.

Om zicht te krijgen op de risico's van cyanotoxines voor het ecosysteem, zijn de volgende vragen onderzocht:

- a. worden toxische cyanobacteriën (o.a. *Microcystis*) überhaupt gegeten?
- b. wat zijn de microcystine concentraties in verschillende voedselketen-componenten?
- c. hoeveel microcystine kan er worden doorgegeven aan hogere trofische niveaus?
- d. accumuleren microcystines in hogere trofieniveau's?
- e. zijn de negatieve effecten een direct gevolg van toxines of ook van lage voedselwaarden?
- f. kan de vissterfte uiteindelijk worden verklaard door microcystines?

Dit document geeft een overzicht over de belangrijkste resultaten uit het onderzoek dat werd uitgevoerd in de jaren 1996 t/m 2003.

Het onderzoek bestond uit twee onderdelen. Er is een monitoring van relevante veldparameters uitgevoerd gedurende het groeiseizoen van het fytoplankton op twee raaien in het IJsselmeer. Dit onderdeel is beschreven in het rapport "Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer. I. Monitoring 1997 t/m 1999" (AquaSense, 2002a).

De tweede deelrapportage "Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer. II. Experimenten 1996 t/m 2000" (AquaSense 2002b) beschrijft de resultaten van experimenteel onderzoek dat is verricht in de jaren 1997 t/m 2000 naar begrazing van toxische cyanobacterie-deeltjes door zoöplankton en mosselen, naar effecten op groei en reproductie van zoöplankton, naar de gevoeligheid van vis voor cyanotoxines en tenslotte naar accumulatie van de toxines in zoöplankton, mosselen. Ook de resultaten van in 1996 uitgevoerde metingen van graas, groei en reproductie van *Daphnia* in IJsselmeer en Markermeer zijn in dit rapport opgenomen. Daarnaast is er in de jaren 2002 en 2003 aanvullend onderzoek uitgevoerd door het NIOO-CL naar "life-history" parameters van *Daphnia*. Tevens werden er graas- en accumulatie-experimenten uitgevoerd en er vond een methode-check plaats van de microcystine analyse (Ibelings *et al.* 2003).

Het onderzoek is gefinancierd door Rijkswaterstaat - Directie IJsselmeergebied en het Hoofdkantoor van Rijkswaterstaat, en uitgevoerd onder begeleiding van het RIZA.

De projectbegeleiding vanuit het RIZA was in handen van achtereenvolgens J. de Jonge, B.W. Ibelings en K. Wolfstein, bijgestaan door een begeleidingscommissie waarin zitting hadden P.C.M. Boers, G.D. Butijn, J. Hendriks, H.H. Reeders, F.I. Kappers, W. Laane en E. Lammens. B. Ibelings, M. Dionisio Pires en K. Bruning als auteurs van de boven genoemde rapportages hebben een groot aandeel aan het voorliggend rapport. Daarnaast kwamen er veel interessante discussies tot stand met T. Burger, A. v. Mullem en J. Postma, die bijdroegen aan de inhoud van dit document. Dank gaat ook aan Colinda Boender-Daane voor haar ondersteuning bij de rapportage.

2 Materiaal en methoden

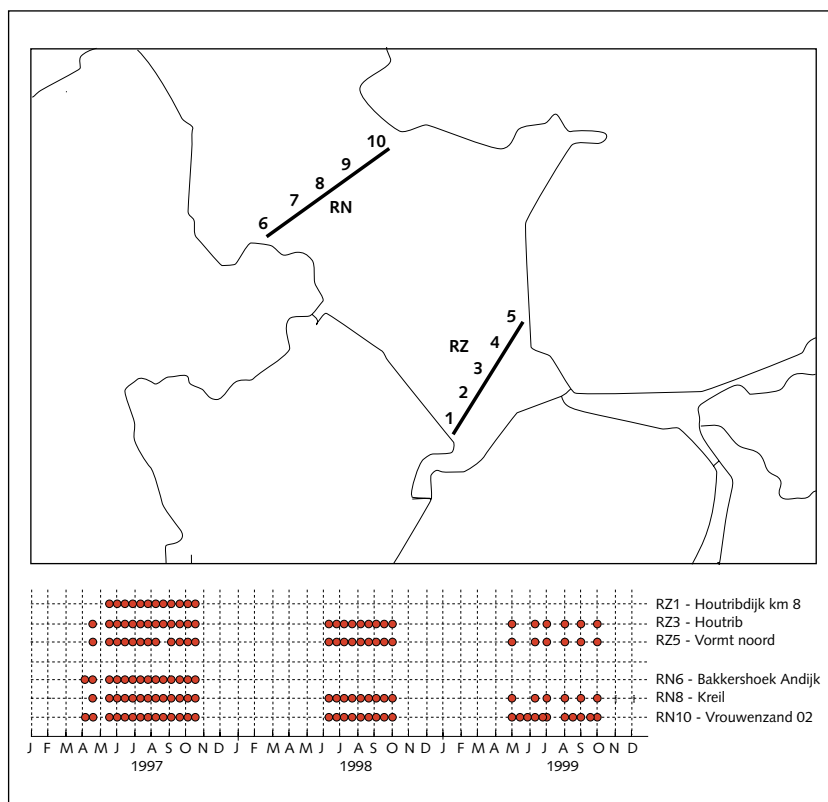
2.1 Monsterlocaties monitoring

Er is bemonsterd langs een noordraai RN en een zuidraai RZ, op 3 monsterlocaties per raai. Het aantal bemonsterde locaties en gemeten parameters varieerde van jaar tot jaar, zie figuur 2.1.

In 1999 zijn aanvullend een aantal fytoplanktonmonsters geanalyseerd afkomstig van een locatie op 2 km afstand van locatie RN10.

Figuur 2.1

IJsselmeer: monsterlocaties en monstertijd stip



2.2 Monsternamen en analyses

2.2.1 Monsternamen

De monsternamen van fytoplankton en zoöplankton vond plaats in de zomermaanden van 1997 t/m 1999 en is gedetailleerd beschreven in de rapportage van AquaSense (2002a). Baars, Pos en Spiering zijn in juni, juli en september 1999 gevangen op drie locaties in het IJsselmeer: Vrouwenzand, Friese Vlak en Val van Urk.

2.2.2 Analyses uitgevoerd door AquaSense

In het laboratorium werden verschillende analyses aan de monsters afkomstig uit het veld (seston, fyto- en zoöplankton, driehoeksmosselen en vis) uitgevoerd (AquaSense 2002a). Daarnaast werden experimenten gedaan met *Daphnia galeata* (watervlo), *Dreissena polymorpha* (driehoeksmossel)

en met Baars en Pos (AquaSense 2002b). Daarbij werden de volgende analyses gedaan:

- Bepaling van de hoeveelheid en soortensamenstelling van fytoplankton en zoöplankton.
- Flowcytometrische analyse van fytoplankton.
- Bepaling van het chlorofyl-a gehalte.
- Bepaling van het asvrij drooggewicht van seston en de verschillende trofieniveau's.
- Analyse van cyanotoxines in verschillende voedselwebcomponenten (anatoxine-a en microcystine).
- Bepaling van de ei-productie (standard egg production, SEP) en "life history" parameters van *Daphnia* (het gemiddelde aantal eieren van dieren met een standaardlengte van 1 mm).
- Histologische beoordeling van de vislevers door Dr. N. Stockhofe-Zurwieden (veterinair patholoog, CIDC-Lelystad).

2.2.3 Analyses uitgevoerd door het NIOO-CL

In de jaren 2002 en 2003 werden verdergaande experimenten uitgevoerd aan *Daphnia galeata* en *Dreissena polymorpha* bij het Nederlands Instituut voor Ecologie- Centrum voor Limnologie (Ibelings *et al.* 2003).

2.2.3.1 Opzet graasproeven

In de graasproeven werden *Daphnia* (60 dieren per 60 ml) en *Dreissena* (5 mosselen per 500 ml) geïncubeerd met seston uit het IJsselmeer bij een temperatuur van 17 °C. Seston werd bemonsterd in oktober 2002 en september 2003. Zowel *Daphnia* als *Dreissena* bestonden uit willekeurig samengestelde mengsels van dieren van diverse grootteklassen (*Daphnia* dus een mix van juveniele en volwassen dieren). De opname van deeltjes (te onderscheiden in cyanobacteriën, overig fytoplankton (groenwieren, diatomeeën etc.) en detritus) werd bepaald op de Europa flowcytometer door op t = 0 en t = 60 minuten watermonsters van de incubaties te nemen. In controles werden veranderingen in deeltjesaantallen in afwezigheid van *Daphnia* en *Dreissena* gemeten. Monsters werden gefixeerd met 0,01% GAPF en opgeslagen in de koelkast. Tevens werden mosselen ingevroren voor analyse van microcystine op de LC-MS (zie onderdeel 2.2.3.3). De clearance rate (CR) werd berekend als:

$$CR = \frac{V}{wt} \left\{ \ln \frac{C_0}{C_t} - \ln \frac{C_0'}{C_t'} \right\}$$

waar:

V = volume van de graaskamer;

w = gesommeerd drooggewicht van de dieren;

t = duur van de graasproef;

C₀ = fytoplankton concentratie start van het experiment in behandeling met dieren;

C_t = fytoplankton concentratie eind van het experiment in behandeling met dieren;

C₀' = fytoplankton concentratie start van het experiment in behandeling zonder dieren;

C_t' = fytoplankton concentratie eind van het experiment in behandeling zonder dieren.

2.2.3.2 Opzet accumulatieproeven

In de accumulatieproeven werden juveniele *Daphnia*'s en *Dreissena* gedurende 7 dagen geïncubeerd bij de condities getoond in tabel 2.1 (gelijk aan life-history proeven, paragraaf 2.2.3.3). Per voedselconditie werden 60 juvenielen

van *Daphnia* gebruikt in een volume van 500 ml. Voor *Dreissena* werd een dichtheid van 5 mosselen per 500 ml gebruikt. Iedere conditie werd in 4-voud uitgevoerd.

.....
Tabel 2.1

Voedselcondities *Daphnia* en *Dreissena*
accumulatieproef

Conditie	Cellen ml ⁻¹
.....
Toxic <i>Microcystis</i> PCC7820	60.000
Toxic <i>Microcystis</i> CYA140	60.000
Non toxic <i>Microcystis</i> CYA43	60.000
Groenwier <i>Scenedesmus</i>	67.000
<i>Scenedesmus</i> + CYA140	67.000 + 60.000

Microcystis PCC7820, die onder andere ook door AquaSense werd gebruikt heeft een hoger toxine gehalte dan *Microcystis* CYA140. Beiden hebben microcystine-LR als dominante type. Als niet-toxische stam werd gewerkt met *Microcystis* CYA43.

Na 7 dagen werd het microcystine gehalte gemeten in *Daphnia* en *Dreissena*. Microcystine werd geëxtraheerd in 75% methanol. De dieren werden eerst 30 minuten in een trilbad geplaatst en vervolgens 2 minuten gesonificeerd. Omdat de hoeveelheden microcystine in *Daphnia* te laag waren voor detectie met HPLC of LC-MS (Liquid chromatography/mass spectrometry) werd microcystine hier met ELISA gemeten. Helaas ontbreken data over het aantal *Daphnia*'s dat na 7 dagen nog in leven was of data over drooggewicht (DW) na 7 dagen. De microcystine gehalten kunnen slechts via een omrekening (gebruik makend van overlevingsdata uit life-history proeven) en een omrekeningsfactor van aantallen *Daphnia* naar DW op biomassa basis worden uitgedrukt.

Na 7 dagen werden "gekoppelde graas-accumulatie proeven" uitgevoerd. Specifiek voor *Dreissena* werd de volgende accumulatieproef uitgevoerd (experiment uit 2002): *Dreissena* werd gedurende 3 weken opgeladen met microcystine door blootstelling aan *Microcystis* PCC7820. Na 3 weken werden de mosselen overgezet op schoon groenalgenvoedsel. Zowel de ophoping als de verdwijning van microcystine uit de mosselen werd gevolgd door analyse van microcystines in mosselweefsel op de LC-MS.

2.2.3.3 Opzet "life-history"proeven

Om de vragen met betrekking tot de "life history" van *Daphnia* te kunnen beantwoorden werden twee experimenten uitgevoerd. In de proeven werden de volgende behandelingen meegenomen:

- Hoogwaardig referentievoedsel (groenalg *Scenedesmus*) in een lage (limiterende) en een hoge (overmaat) dichtheid.
- Toxische *Microcystis* in een lage en een hoge dichtheid (*Microcystis* CYA140 in het eerste experiment en *Microcystis* PCC7820 in het tweede experiment).
- Non toxische *Microcystis* (*Microcystis* CYA43) in een lage en een hoge dichtheid.
- Aan- of afwezigheid van lipopolysachariden (LPS).

De concentratie LPS bedroeg 0,5 µg l⁻¹, gelijk aan de concentratie die door Best *et al.* werd gebruikt in studies met zebra vissen (Best *et al.* 2002). Er wordt verwacht dat *Daphnia* die wordt blootgesteld aan een hoge dosis toxische *Microcystis* de traagste ontwikkeling te zien geeft, onder condities waaronder de hoeveelheid hoogwaardig voedsel limiterend is, en LPS aanwezig is zodat detoxicatie wordt geremd. Omgekeerd zou *Daphnia* met lage dosis toxische *Microcystis*, véél *Scenedesmus* en zonder LPS de snelste ontwikkeling moeten doormaken.

De proef werd opgezet als een factoriele proef met 4 variabelen, ieder met een hoge en een lage waarde (42 proef). De proef als geheel werd gedupliceerd (A, B). Factoriele proeven hebben als voordeel dat interacties tussen variabelen beter kunnen worden bestudeerd terwijl de hoofdeffecten met minder replica's kunnen worden vastgesteld.

De *Daphnia* kloon die werd gebruikt (*Daphnia galeata* kloon Y9) werd recent uit het IJsselmeer geïsoleerd en gekarakteriseerd. Er werd altijd gewerkt met het tweede broed. In de voorkweek werd *Daphnia* uitsluitend gevoed met *Scenedesmus*.

In de life-history proef werden de volgende parameters gemeten:

- Age at maturity (AAM) - de leeftijd waarop *Daphnia* volwassen wordt (de eerste eieren draagt).
- Size at maturity (SAM) - de lengte waarbij AAM wordt bereikt.
- Juveniele groeisnelheid *g*, berekend uit AAM en SAM.

Tabel 2.2

Factoriele opzet eerste life-history proef. De tweede life-history proef was identiek qua opzet met uitzondering van het vervangen van CYA140 door PCC7820. In de opzet sluiten niet-toxische en toxische *Microcystis* elkaar uit, dat wil zeggen dat CYA43 nooit tezamen met een toxische stam werd toegediend. Legenda: S = *Scenedesmus*; T = Toxische *Microcystis*; N = Niet-toxische *Microcystis*; L = LPS; niveau 2 = hoge dosis; niveau 1 = lage dosis

Opzet	S		T		N		L	
	S2 Scened. 67,000 cellen ml ⁻¹	S1 Scened. 3,000 cellen ml ⁻¹	T2 CYA140 60,000 cellen ml ⁻¹	T1 CYA140 15,000 cellen ml ⁻¹	N2 CYA-43 60,000 cellen ml ⁻¹	N1 CYA-43 15,000 cellen ml ⁻¹	L2 LPS Ja	L1 LPS Nee
1: S2T2L2	X		X				X	
2: S2T2L1	X		X					X
3: S2T1D2	X			X			X	
4: S1T2L2		X	X				X	
5: S2T1L1	X			X				X
6: A1B2D1		X	X					X
7: S1T1L2		X		X			X	
8: S1T1L1		X		X				X
9: S2N2L2	X				X		X	
10: S2N2L1	X				X			X
11: S2N1L2	X					X	X	
12: S1N2L2		X			X		X	
13: S2N1L1	X					X		X
14: S1N2L1		X			X			X
15: S1N1L2		X				X	X	
16: S1N1L1		X				X		X

2.2.3.4 Methode-check microcystine analyse

Microcystines kunnen voorkomen in vrije vorm of covalent gebonden aan eiwitfosfatases. Daarnaast zijn minder toxische detoxicatieproducten in dierlijk en plantaardig weefsel beschreven. In de afgelopen jaren vonden steeds meer methodieke ontwikkelingen plaats, om de verschillende microcystine vormen zoals detoxicatie conjugaten (verbinding van toxine en glutathion S-transferase) en covalent gebonden microcystines te meten. Daarnaast bestond de behoefte om de standaard HPLC-analyse te vergelijken met microcystine analyse op de LC-MS (Liquid chromatography/mass spectrometry), waar microcystine pieken met grotere zekerheid herkend kunnen worden. Daarvoor werd contact gezocht met het lab van J. Meriluoto van de Åbo Akademi University in Turku (Finland), één van de leidende laboratoria op het gebied van analyse van cyanobacterie toxines. In het algemeen werd daar de methode van Tsuji *et al.* (2001) gebruikt voor het analyseren en kwantificeren van microcystines en detoxicatie

conjugaten op de LC-MS, welke een modernere en gevoeliger techniek is dan die van Williams *et al.* (1997). De methode staat bekend als MMPB (2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid); het is in principe een Lemieux oxidatie (zie literatuur in Chorus & Bartram 1999). De volgende stappen werden gedaan:

- Direct invriezen van de beesten in vloeibare stikstof.
- Monsters oplossen in 500 ml 75% methanol.
- Centrifugeren gedurende 10 minuten bij 10.000 x g.
- Supernatant overbrengen naar LC-MS vials en 10 µl injecteren in LC-MS.
- Instrument was ingesteld op "multiple reactant monitoring" voor microcystine-LR.
- Monsters worden gekalibreerd en gekwantificeerd op basis van piekoppervlak.
- Microcystine wordt uitgedrukt per eenheid DW.

Het gebruikte instrument was een Quattro Micro (Micromass, Manchester, UK) triple quadrupole MS gekoppeld aan een Agilent 1100 series HPLC. De kolom was een purospher STAR C18e 30 x 4 mm. Gradient run met 0,5% formic acid (25% - 70% in 10 minuten) en acetonitril.

3 Resultaten

3.1 Graas op (toxische) cyanobacteriën

3.1.1 Begrazing van IJsselmeer-seston door *Daphnia*

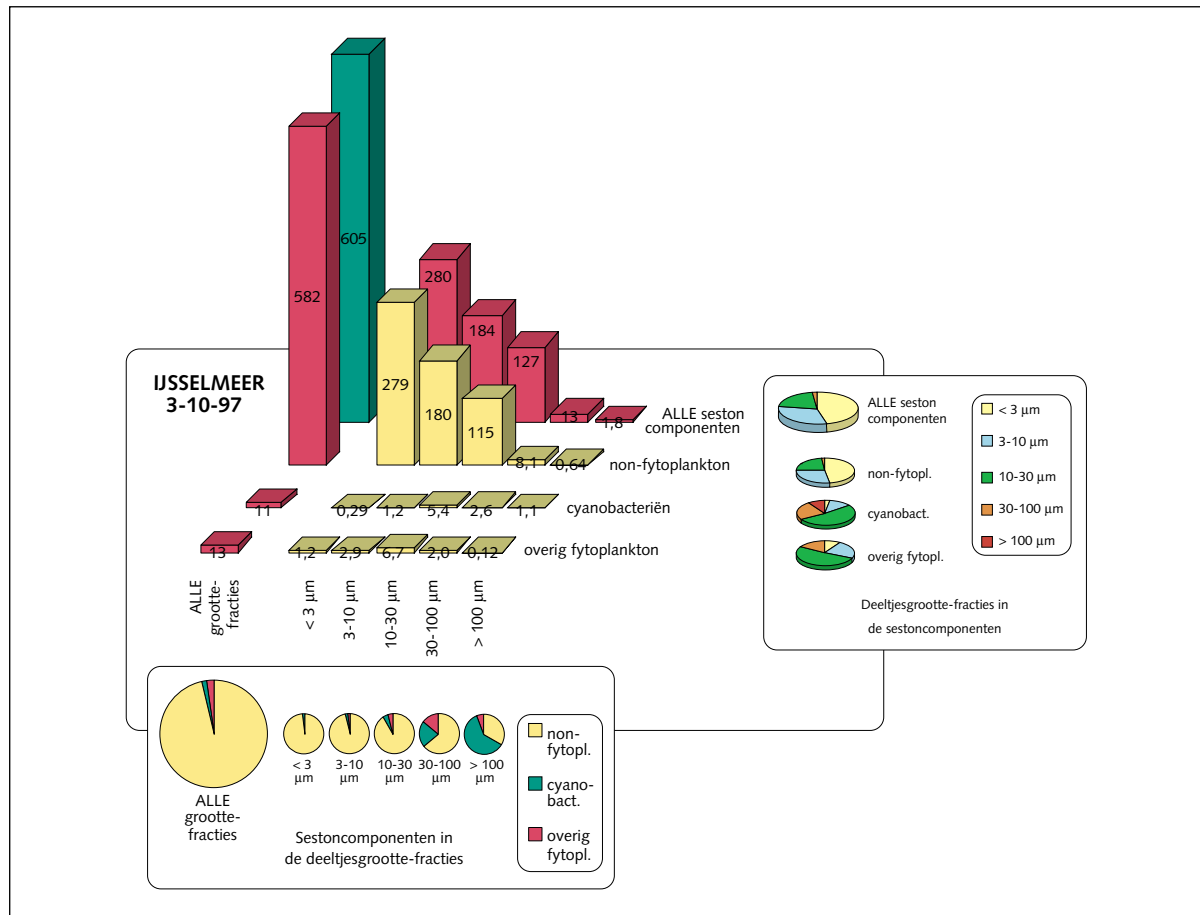
De mate waarin verschillende types sestondeeltjes door zoöplankton worden begraasd, en dus ook de mate waarin cyanotoxines in zoöplankton terechtkomen, hangt af van verschillende factoren:

- deeltjesaantallen;
- selectie op vorm, grootte en chemische deeltjeseigenschappen;
- de aanwezigheid van alternatieve voedselbronnen.

Om na te gaan óf de cyanobacteriedeeltjes uit het IJsselmeer werden begraasd en in hoeverre ze deel uitmaakten van het zoöplanktondiët werd de begrazing van afzonderlijke deeltjesgroepen door *Daphnia* gemeten met behulp van flow-cytometrie. Figuur 3.1 geeft een gedetailleerd beeld van de sestonsamenstelling in het IJsselmeerwater waarmee de graasmeting is uitgevoerd. Opvallend was dat het seston voor het overgrote deel (96%) uit non-fytoplankton bestond.

Figuur 3.1

Flowcytometrisch bepaalde sestonsamenstelling IJsselmeer. De getallen bij de kolommen geven de aantallen deeltjes per µl



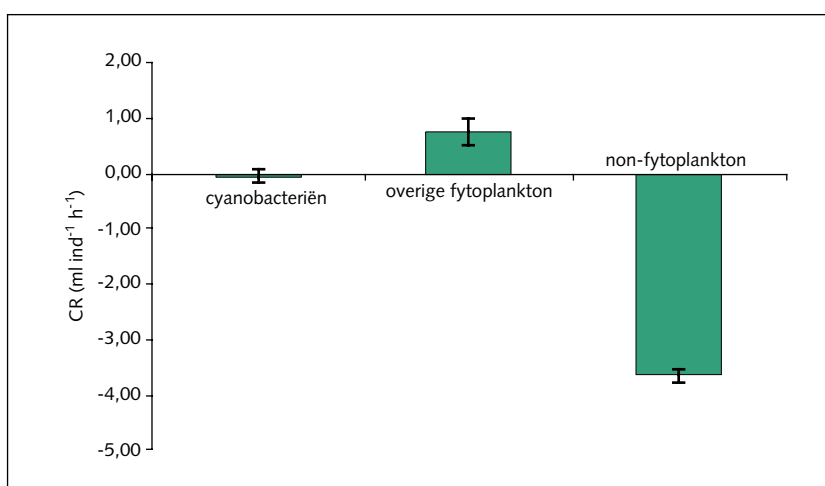
Bijna de helft van deze deeltjes waren kleiner dan 3 µm. Het hoge percentage non-fytoplankton kan ten dele het gevolg zijn van de monstername vlak bij de oever, maar in het algemeen worden hoge percentages non-fytoplankton in het IJsselmeer gevonden, in 1997 gemiddeld zo'n 85% (AquaSense 2002a, Figuur 5). Het lage aandeel van cyanobacteriën in het *Daphnia* dieet is dan ook vooral het gevolg van de grote overmaat aan non-fytoplankton deeltjes in het seston.

Op biomassa- of C-basis zal non-fytoplankton overigens een minder belangrijke voedselcomponent zijn dan figuur 3.1 suggereert, omdat non-fytoplankton relatief veel kleine deeltjes bevat. Slechts 1,3% van het dieet van *Daphnia* bestond uit cyanobacteriën, die het hoogste aandeel hadden in de fractie 10 - 30 µm (AquaSense 2002b). Echter, de clearance rates per deeltjesgrootte klasse laten zien dat ook de grotere deeltjes in het *Daphnia* dieet vooral uit non-fytoplankton bestaan.

Clearance rate ($ml\ individu^{-1}\ h^{-1}$): Maat voor alle graasactiviteit van een filtreerder (in volume water uit welk een individu in een bepaalde tijd alle voedsel heeft verwijderd)

De clearance rate van *Daphnia* (mix van jong en oud) op IJsselmeer-seston werd bepaald door het NIOO-CL en AquaSense (figuren 3.2, 3.3 en 3.4). Op de monsterdatum bestond (zoals altijd, zie ook figuur 3.1) slechts een kleine minderheid van het seston uit fytoplankton, in dit geval slechts 4% waarvan 3% cyanobacteriën. Figuur 3.2 toont de clearance rate uitgesplitst naar hoofdgroep van het fytoplankton, figuur 3.3 uitgesplitst naar grootte klasse. Cyanobacteriën worden gemeden door *Daphnia*, die een voorkeur toont voor overig fytoplankton (groenwieren, diatomeeën etc., zie ook figuur 3.4). Er is een negatieve clearance rate op detritus (er komen deeltjes bij), waarschijnlijk als gevolg van faeces productie door *Daphnia*. Uitgesplitst naar grootte lijkt *Daphnia* geen voorkeur te hebben voor een bepaalde fractie, dit in tegenstelling tot eerdere graasproeven waarin *Daphnia* een voorkeur toonde voor deeltjes kleiner dan 30 µm (figuur 3.4).

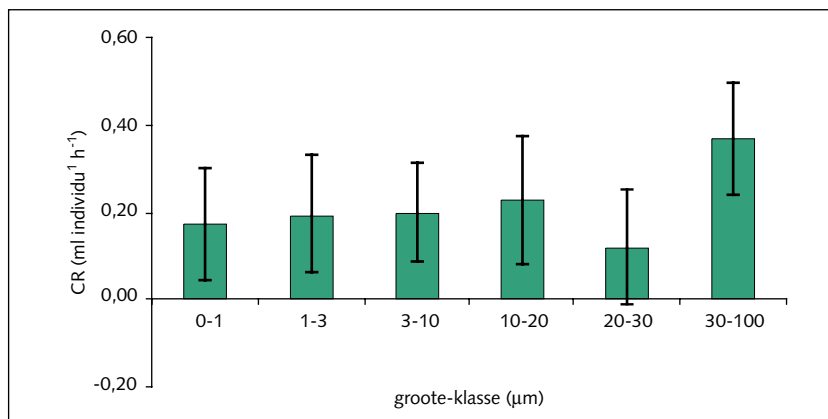
Figuur 3.2
Clearance rate van *Daphnia* (mix juveniel en volwassen) op verschillende sestongroepen uit het IJsselmeer, gemeten op 03-09-2003.



Blijkbaar nam *Daphnia* in tegenstelling tot 2003 in 2002 wél cyanobacteriën op (positieve clearance rate). Het graasgedrag van *Daphnia* in de proeven is niet consistent (figuur 3.3 en 3.4), hetgeen af kan hangen van de samenstelling (en toxiciteit van het seston).

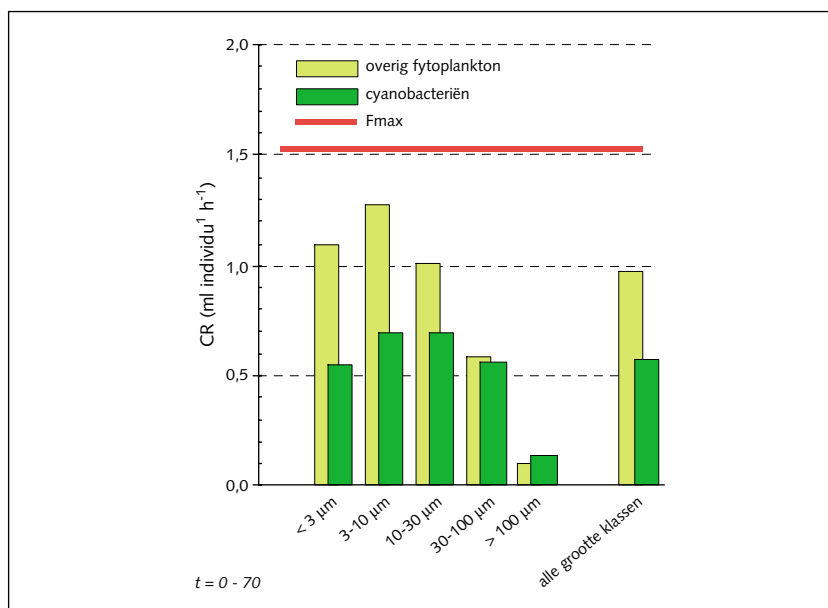
Figuur 3.3

Clearance rate van *Daphnia* (juveniel en volwassen) op verschillende grootte-
klassen van het IJsselmeer-seston,
gemeten op 03-09-2003



Figuur 3.4

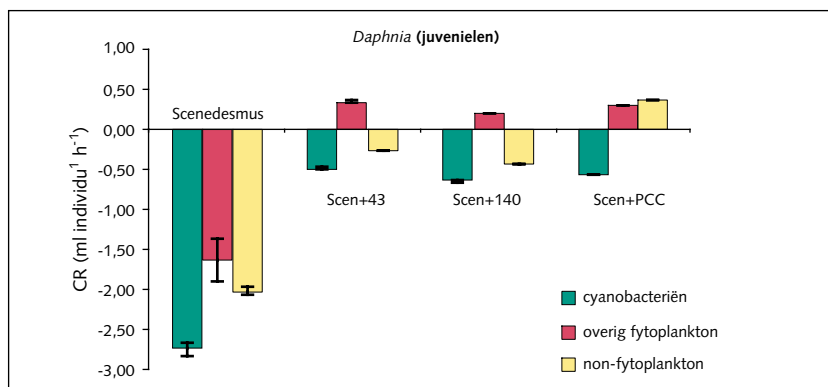
Clearance rate van *Daphnia galeata*
voor verschillende componenten van
het IJsselmeer-fytoplankton. De grijze
balk geeft een indicatie van de maximale
filtering rate (Burns 1967 in AquaSense
2002a)



De blootstelling gedurende één week aan al of niet toxisch voedsel leidt niet tot duidelijke verklaarbare effecten op het graasgedrag (figuur 3.5). De negatieve clearance rate van *Daphnia* op veel fracties (met name bij *Daphnia* die werd gevoed met uitsluitend *Scenedesmus*) is opvallend en voorsnog niet eenvoudig verklaarbaar. *Scenedesmus* in combinatie met één van de 3 *Microcystis* stammen geeft geen onderscheid in clearance op fytoplankton groepen. Blootstelling aan toxische *Microcystis* (PCC7820, CYA140) leidt niet tot een verminderd vermogen tot graas op fytoplankton.

Figuur 3.5

Clearance rate van juveniele *Daphnia*
op verschillende sestongroepen uit het
IJsselmeer (03-09-03). Op de x-as staat
de behandeling van *Daphnia* in de
week voor de graasproef



Uit het onderzoek kan worden geconcludeerd, dat een aantal mechanismen het zoöplankton een zekere bescherming kan bieden tegen blootstelling aan cyanotoxines:

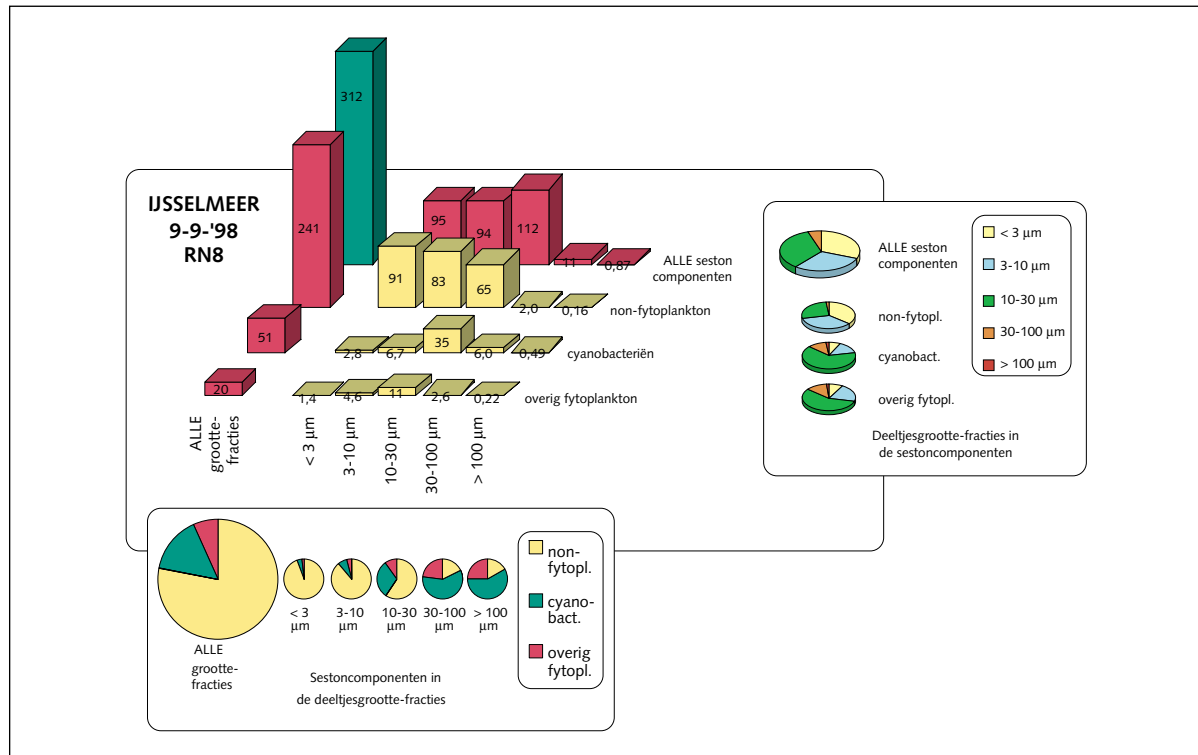
- Er zitten veel non-fytoplankton deeltjes in het IJsselmeer- en Markermeer-seston waardoor ook bij hoge cyanobacterie-dichtheden de fractie cyanobacteriën in het dieet laag blijft.
- De overmaat aan non-fytoplankton deeltjes kan voor niet-selectieve grazers als *Daphnia* in feite een bescherming vormen tegen toxische cyanobacteriën. Zonder deze sestoncomponent zouden cyanobacteriën 45% van het *Daphnia*- dieet uitmaken, met een veel hogere blootstelling aan cyanotoxines tot gevolg.
- De resultaten van de graasproeven zijn niet consistent, maar op basis van alle waarnemingen lijken de kleinere sestondeeltjes, een fractie met relatief weinig cyanobacteriën, het effectiefst te worden begraasd. De clearance rate toont dat zowel cyanobacteriën als overige algen worden gegeten. Goed begraasbaar voor *Daphnia* is fractie 3 - 30 μm ; de meeste deeltjes vallen in deze fractie. (Kolonievormende) cyanobacteriën domineren in de fractie > 100 μm – deze worden slecht begraasd.
- Cyanobacteriën lijken minder effectief te worden begraasd dan overig fytoplankton, zelfs door een weinig selectieve grazer als *Daphnia*.
- Er zijn aanwijzingen voor remming van de filtratieactiviteit van het zoöplankton door de aanwezigheid van cyanobacteriën (inhibitie), een mechanisme dat er toe leidt dat vooral op tijden of plaatsen met weinig cyanobacteriën wordt gegraasd.

3.1.2 Begrazing van IJsselmeer-seston door *Dreissena*

Figuur 3.6 geeft nog een voorbeeld van de sestonsamenstelling van het IJsselmeerwater. Het seston bestond voor 23% uit fytoplankton waarvan 71% cyanobacteriën.

Figuur 3.6

Flowcytometrisch bepaalde sestonsamenstelling IJsselmeerwater tijdens de *Dreissena*-graasmeting van 9 september 98. De getallen bij de kolommen geven aantallen deeltjes per μl .

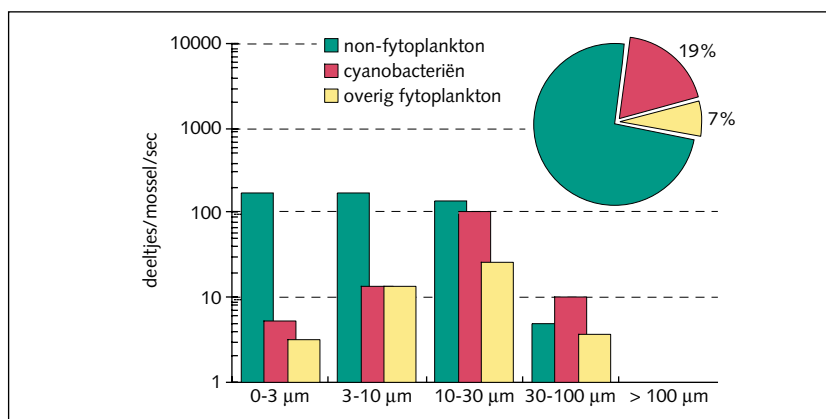


Natuurlijk IJsselmeer-seston werd door *Dreissena* aselectief begraasd: de verschillende sestoncomponenten (non-fytoplankton, cyanobacteriën en overig fytoplankton) en de verschillende deeltjesgrootte-fracties werden ongeveer even effectief uit het water gefilterd. De grotere deeltjes van het overig fytoplankton lijken wel moeilijker begraasd te worden, maar de verschillen tussen de clearance rates zijn niet significant.

In figuur 3.7 zijn de clearance rates van de verschillende sestoncomponenten weergegeven met de daaruit geschatte samenstelling van het dieet van de driehoeksmosselen in het IJsselmeer. Omdat de begrazing niet selectief was, komt de samenstelling van het mosseldieet overeen met de samenstelling van het IJsselmeer-seston.

Figuur 3.7

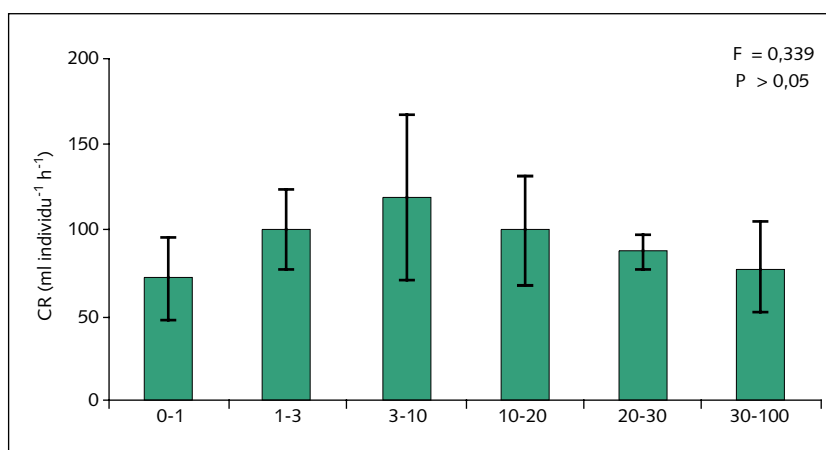
Clearance rates van *Dreissena* voor verschillende componenten van het IJsselmeer-seston, afkomstig van monsterpunt RZ3, 9-9-98. De cirkel geeft het aandeel cyanobacteriën, overig fytoplankton en non-fytoplankton in de door *Dreissena* verzamelde voedseldeeltjes



Figuur 3.8 (resultaten uit het onderzoek van het NIOO) toont overeenstemming met het algemene beeld van graas door *Dreissena* op IJsselmeer-seston, zoals dat eerder door AquaSense werd gevonden.

Figuur 3.8

Clearance rate *Dreissena polymorpha* op verschillende grootteklassen van het IJsselmeer-seston (oktober 2002)



3.1.3 Vergelijking graasgedrag *Daphnia* en *Dreissena*

Uit de graasproeven met *Daphnia* en seston van het IJsselmeer komt geen consistent beeld naar voren. Op basis van alle waarnemingen tezamen zou moeten worden vastgesteld dat *Daphnia* een voorkeur heeft voor een relatief kleine fractie, nl. 1 - 30 µm, terwijl *Dreissena* over de gehele range (tot 100 µm) deeltjes opneemt. Voor beide filtreerders geldt dat er in het algemeen geen selectie op fytoplankton groep plaatsvindt. Al het fytoplankton (inclusief cyanobacteriën) wordt met ongeveer gelijke efficiëntie verwijderd uit het water. Daarom nemen zowel *Daphnia* als *Dreissena*

microcystine op indien toxische *Microcystis* aanwezig is in het voedsel. Opname van microcystine gedurende één week blootstelling aan toxische *Microcystis* heeft geen negatief effect op het graasgedrag van zowel *Daphnia* als *Dreissena*.

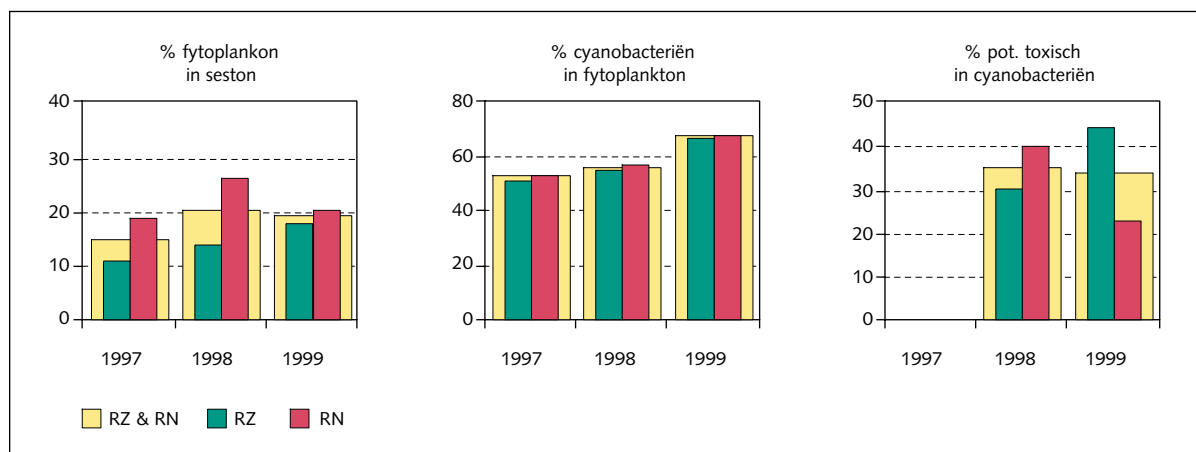
3.2 Concentratie van microcystine in de voedselketen

Tijdens de monitoring in het IJsselmeer van 1997 tot en met 1999 werd de samenstelling van het seston, het fytoplankton en zoöplankton bepaald. Daarnaast werden microcystine gehalten in de verschillende componenten van de voedselketen onderzocht. De belangrijkste resultaten worden in de volgende paragrafen gepresenteerd.

3.2.1 Samenstelling en microcystine gehalten in het seston van het IJsselmeer

Van 1997 tot en met 1999 werden de deeltjesaantallen van de sestonmonsters uit het IJsselmeer zoals cyanobacteriën, overig fytoplankton en non-fytoplankton (deeltjes zonder chlorofylfluorescentie) flowcytometrisch bepaald. In figuur 3.9 wordt de seizoensgemiddelde sestonsamenstelling per raai vergeleken. De figuur geeft de percentages gemiddeld over de periode 15 juni - 6 oktober, de periode waarin voor alle jaren metingen aanwezig zijn. Slechts maximaal eenderde van de sestondeeltjes bestond uit fytoplankton. In de loop van het seizoen nam het aandeel cyanobacteriën in het fytoplankton toe tot 75 à 90% in september. Het aandeel van potentieel toxische cyanobacteriesoorten hierin bereikte waarden tot maximaal 90% in 1998, maar varieerde sterk naar tijd en locatie.

Figuur 3.9
Raaigemiddelde sestonsamenstelling voor de periode 15 juni t/m 6 oktober



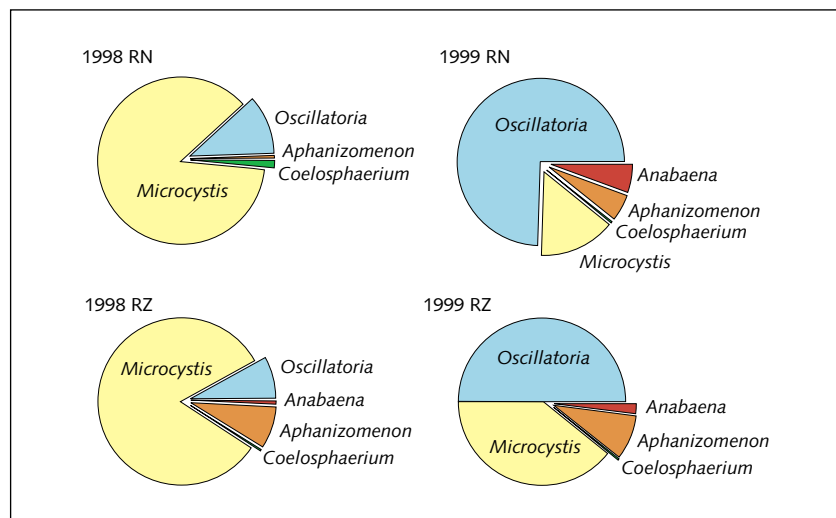
Op de noordraai bevatte het seston gemiddeld steeds meer fytoplankton dan op de zuidraai. De in het algemeen lagere fytoplanktendichtheid in het zuidelijk deel van het IJsselmeer wordt door Lammens (1999) toegeschreven aan de hogere dichtheid van driehoeksmosselen in dit deel. Het aandeel van cyanobacteriën in het fytoplankton is op beide raaien nagenoeg gelijk. In 1999 bevatten de cyanobacteriën op de zuidraai gemiddeld significant meer potentieel toxische deeltjes dan op de noordraai (t-toets voor gepaarde waarden, $\alpha = 0,05$). Vooral in 1997 waren er veel non-fytoplankton deeltjes.

Bijna altijd waren op beide raaien potentieel toxische cyanobacteriën aanwezig. Slechts tweemaal werden er op een raai geen potentieel toxische soorten aangetroffen: op 6 mei 1999 en op 15 augustus 2001, beide keren op de noordraai.

De potentieel toxische cyanobacteriën behoorden tot de geslachten *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktotrix*), *Aphanizomenon*, *Anabaena* en *Coelosphaerium*.

Figuur 3.10 laat zien dat de gemiddelde samenstelling van de toxische cyanobacteriën, berekend uit microscooptellingen, sterk veranderde tijdens de onderzoeksperiode. De verdeling is berekend uit deeltjesaantallen per soort. In 1998 was *Microcystis* de meest voorkomende potentieel toxische cyanobacterie. Uit de globale tellingen van 1997 is op te maken dat dat toen ook het geval was. In 1999 was echter *Oscillatoria* gemiddeld het meest talrijk, vooral op de noordraai. Beide soorten produceren verschillende varianten van microcystine. Die van *Oscillatoria* staat als minder toxisch bekend.

Figuur 3.10
Gemiddeld aandeel (gebaseerd op deeltjes/ μ l) van de potentieel toxische cyanobacteriegenera op de noord- en zuidraai van het IJsselmeer

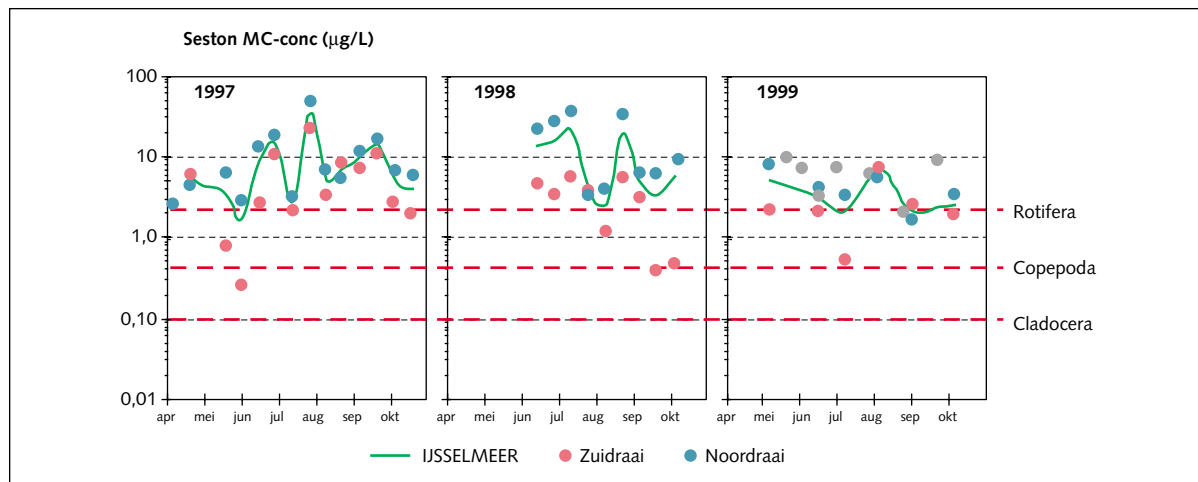


In bijna alle monsters werd een wisselend aantal (1 - 12) microcystines in het seston aangetroffen. Alleen in 1997, bij de lage cyanobacterie-dichtheden in mei en juni, was in drie monsters het seston-microcystine gehalte onder het detectieniveau. Het seston-microcystine bestond merendeels uit met de HPLC-methode niet te identificeren microcystine types. Slechts 4 monsters uit 1997 bevatten het bekende microcystine-LR, in percentages van 2 - 11%. Microcystine-LR wordt in het algemeen als het meest voorkomende microcystine genoemd, maar wellicht speelt hierbij mee dat microcystine-LR het eerste met HPLC identificeerbare microcystine was (Chorus & Bartram 1999). In een in 1998 uitgevoerde inventarisatie bevatte tweederde van de Nederlandse recreatiewateren waarin microcystine werd aangetroffen geen microcystine-LR (STOWA 2000).

De gemeten microcystine concentraties, uitgedrukt in microcystine-LR equivalenten, varieerden van 0 tot 68 μ g/l. Bijna steeds was de microcystine concentratie boven de door de WHO voorgestelde drinkwaternorm van 1 μ g/l (Chorus and Bartram 1999). Enkele malen werd de door de WHO voorgestelde norm voor recreatiewater (20 μ g/l) overschreden, vooral op de noordraai (figuur 3.11).

Figuur 3.11

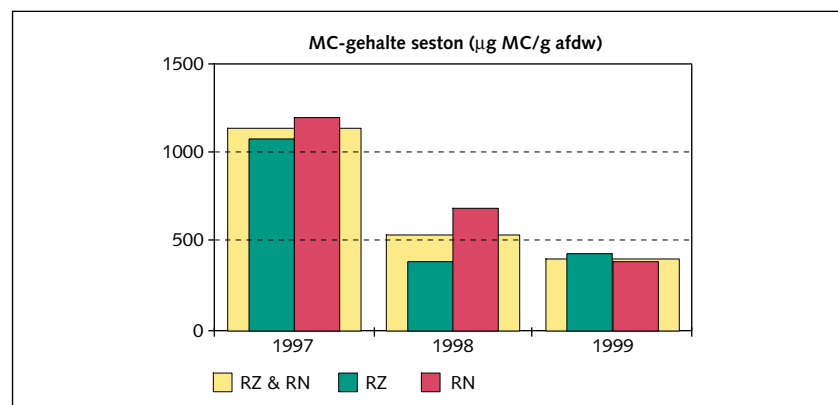
Seston-MC concentratie gemiddeld voor zuidraai en noordraai van het IJsselmeer (punten), en voor alle monsters (lijn). Grijs punten in 1999 betreffen een locatie in de buurt van RN10. Onderbroken lijnen geven voor drie zoöplanktongroepen een indicatie van MC-concentraties waarbij negatieve effecten op kunnen treden (AquaSense 1996a)



Deze seizoensgemiddelde seston-microcystine gehalten varieerden van 2,8 µg/l op de zuidraai in 1999 tot 17 µg/l op de noordraai in 1998. Ter vergelijking kan een in 1998 uitgevoerde inventarisatie van seston-microcystine dienen (STOWA 2000, AquaSense 2000). De gemiddelde microcystine concentratie in 48 Nederlandse recreatiewateren, geselecteerd op het voorkomen van blauwalgproblemen, was 11 µg/l. De raaigemiddelden van 2,8 en 17 µg/l werden in respectievelijk 52% en 21% van deze wateren overschreden. Het microcystine gehalte kan ook worden weergegeven als microcystine per g asvrij drooggewicht (afdww) seston, om beter in relatie te kunnen worden gebracht met de gehalten in dierlijke organismen zoals zoöplankton. Deze seizoensgemiddelde seston-microcystine gehalten varieerden van 400 µg/g afdw op de zuidraai in 1998 tot 1.050 µg/g afdw op de noordraai in 1997. Ter vergelijking: in bovengenoemd onderzoek (STOWA 2000, AquaSense 2000) werd een gemiddeld microcystine gehalte van 640 µg/g afdw gevonden. Genoemde raaigemiddelden van 400 en 1.050 µg/l werden in respectievelijk 50% en 15% van deze wateren overschreden. In figuur 3.12 zijn de seizoensgemiddelde microcystine gehalten van het seston naast elkaar gezet, berekend over de periode 15 juni t/m 6 oktober. Het gemiddelde microcystine gehalte was in 1997 significant hoger dan in 1998 (t-toets, $\alpha = 0,05$). In 1998 was het gemiddelde microcystine gehalte op de noordraai significant hoger dan op de zuidraai (t-toets voor gepaarde waarden, $\alpha = 0,05$).

Figuur 3.12

Gemiddeld microcystine gehalte van het seston, berekend over de periode 15 juni t/m 6 oktober



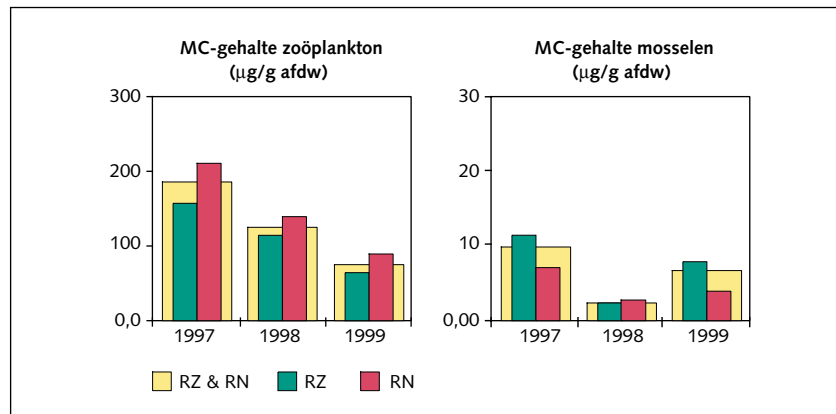
In 1998 zijn bepalingen van het neurotoxische anatoxine-a in het seston uitgevoerd. Dit cyanotoxine kan o.a. voorkomen in de cyanobacteriegenera *Anabaena* en *Aphanizomenon*. *Anabaena* werd in 1998 nauwelijks waargenomen, *Aphanizomenon* is wel op meerdere datums aangetroffen, vooral op monsterpunt RZ3. In geen van de sestonmonsters werd echter anatoxine-a gevonden.

3.2.2 Microcystine in zoöplankton en mosselen

In 80% van de zoöplanktonmonsters en 89% van de mossel-monsters werd een wisselend aantal microcystines gevonden. In het zoöplankton kwamen 1 - 12 op basis van hun retentietijd te onderscheiden microcystine types per monster voor; de mossel-monsters bevatten 1 - 7 microcystine types. Het bekende microcystine-LR kwam in zoöplankton en mosselen niet voor.

In figuur 3.13 zijn seizoensgemiddelde (15 juni t/m 6 oktober) microcystine gehalten van zoöplankton en mosselen naast elkaar gezet. De seizoensgemiddelde microcystine gehalten varieerden van 63 tot 211 µg/g afdw in het zoöplankton en van 2,3 tot 12 µg/g afdw in de mosselen. Het microcystine gehalte van de mosselen was steeds veel lager dan van het zoöplankton, vooral in 1998. Het gemiddelde microcystine gehalte van het zoöplankton was op de noordraai steeds hoger dan op de zuidraai. Maar bij deze getallen moet er rekening worden gehouden met de wisselende sestongehalten. Zo kan voor de jaren 1997 en 1998 het hogere microcystine gehalte van het seston een verklaring zijn. Het microcystine gehalte van zoöplankton en mosselen is positief gecorreleerd met het microcystine gehalte van het seston. Voor zoöplankton is deze correlatie significant ($r^2 = 0,81$, $\alpha = 0.05$).

Figuur 3.13
Gemiddelde microcystine gehalten van zoöplankton en mosselen, berekend over de periode 15 juni t/m 6 oktober



3.2.3 Microcystine in IJsselmeer-vis

Uit worst case berekeningen kwam naar voren dat zoöplanktonetende vissen voldoende microcystines binnen kunnen krijgen om daar schadelijke gevolgen van te kunnen ondervinden (AquaSense 1996b). Microcystines accumuleren in de lever en leiden daar tot leverbeschadigingen (AquaSense 1996b, AquaSense 2000). Onderzocht is of in levers van Baars, Pos en Spiering uit het IJsselmeer microcystine en daaraan gerelateerde leverschade kan worden aangetoond.

Op 28 juni, 19 juli en 20 september 1999 zijn in het IJsselmeer Baars en Spiering bemonsterd op de locaties Vrouwenzand en Gat van Urk, en Pos op de locaties Vrouwenzand en Friese Vlaak. Van deze locaties is per vangstdatum bij 3 exemplaren van de genoemde vissoorten het microcystine gehalte in de lever bepaald. Een deel van de levers is tevens onderzocht op het voorkomen van histologische afwijkingen (AquaSense 2002a).

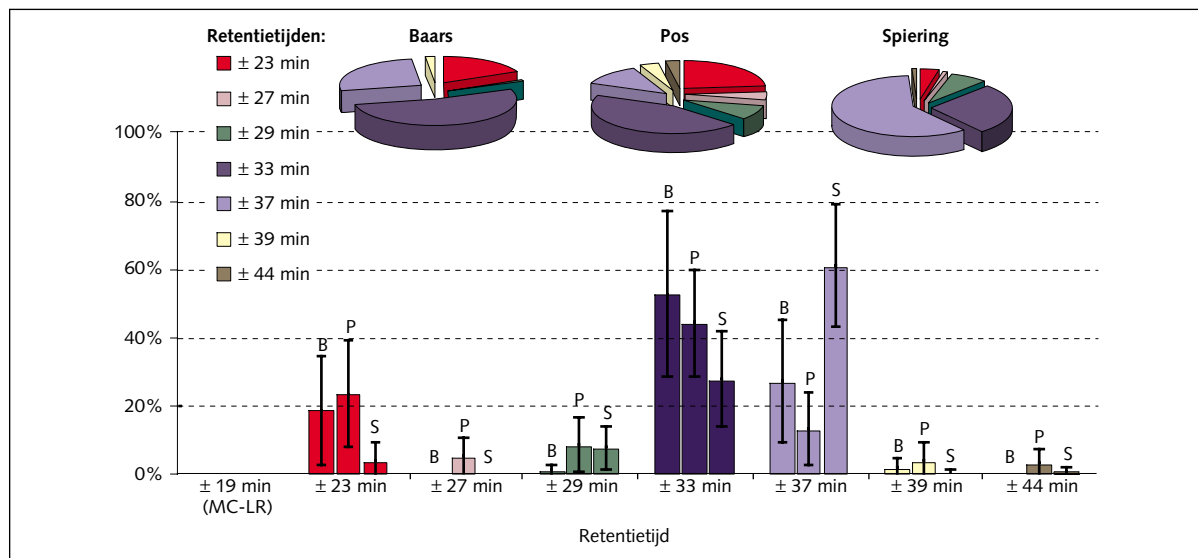
In alle levers werden aantoonbare hoeveelheden microcystine aangetroffen met een variatie van 8 - 874 µg/g lever afdw (2 - 205 µg/g lever ww = natgewicht). Het gemiddelde microcystine gehalte van de levers verschilde per vissoort (zie tabel 3.1). Spieringlevers hadden met een gemiddelde waarde van 218 µg/g lever afdw een significant hoger microcystine gehalte dan Baars- (24 µg/g lever afdw) of Poslevers (54 µg/g lever afdw). Het verschil kan wellicht worden gerelateerd aan de verschillende voedselbronnen van deze vissoorten. Spiering is een zoöplanktoneter, en staat dus in de voedselketen dicht bij het fytoplankton. Pos voedt zich voornamelijk met vlokreeften en muggenlarven, terwijl Baars van de onderzochte lengte (11 - 17,5 cm) behalve op zoöplankton en andere ongewervelden ook op vis jaagt (Nijssen & de Groot 1987).

Tabel 3.1
Gemiddelde microcystine gehalten (n = 3) van vislevers uit het IJsselmeer

MC-gehalte lever		BAARS	POS	SPIERING	
Gat van Urk	28-Jun-99	26.9		141.4	µg/g AFDW
Gat van Urk	19-Jul-99	23.4		241.7	µg/g AFDW
Gat van Urk	20-Sep-99	17.0		200.4	µg/g AFDW
Vrouwezeand	28-Jun-99	16.4	39.3	384.4	µg/g AFDW
Vrouwezeand	19-Jul-99	29.6	82.7	119.6	µg/g AFDW
Vrouwezeand	20-Sep-99	32.1	31.0	221.0	µg/g AFDW
Friese Vlaak	28-Jun-99		28.5		µg/g AFDW
Friese Vlaak	19-Jul-99		46.5		µg/g AFDW
Friese Vlaak	20-Sep-99		94.7		µg/g AFDW
gemiddeld		24.2	53.8	218.1	µg/g AFDW
gemiddeld		5.7	12.6	51.2	µg/g WW

Evenmin als in het zoöplankton en de mosselen werd in de vislevers het bekende microcystine-LR aangetroffen. De levers bevatten een wisselend aantal (1 - 5) van in totaal 7 andere, onbekende microcystine types met genormeerde HPLC-retentietijden tussen 23 en 44 minuten. Het microcystinespectrum van de levers verschilde per vissoort (figuur 3.14). Vooral de microcystine types in Spieringlevers waren duidelijk anders dan in Baars en Pos. Het aandeel van microcystine met een genormeerde retentietijd van ± 37 minuten was bij Spiering significant hoger dan bij Pos en Baars.

Figuur 3.14
Gemiddeld aandeel van verschillende microcystine types in levers van Baars, Pos en Spiering, met 95% betrouwbaarheidsintervallen



Ook bij experimentele blootstelling van vissen aan microcystine-LR kon geen microcystine-LR (genormeerde retentietijd rond 19 minuten) in vis worden aangetoond. In tabel 3.2 zijn van 15 levers van door forced feeding aan microcystine blootgestelde Possen de genormeerde retentietijden van de verschillende als microcystine geïdentificeerde HPLC-pieken vermeld. Er werden tot 10 verschillende microcystine types in de vislevers aangetroffen, maar geen microcystine-LR. Hier kunnen diverse verklaringen voor zijn: Wellicht worden er omzettings- of detoxicatieproducten van in de lever opgenomen toxines gemeten, die een andere retentietijd kunnen hebben dan het oorspronkelijke microcystine-LR (Chorus 2001). Een andere verklaring kan zijn dat er in de Poslevers reeds microcystine aanwezig was, van andere types dan LR. Dit is niet onmogelijk aangezien ook microcystine wordt aangetroffen in twee van de drie levers van vissen die niet experimenteel aan microcystine hebben blootgestaan. Een derde verklaring kan zijn dat er sprake is van met de HPLC-techniek niet van microcystines te onderscheiden storende stoffen.

Tabel 3.2

Microcystine gehalte en microcystine types (HPLC) in levers van Possen na experimentele blootstelling aan microcystine-LR

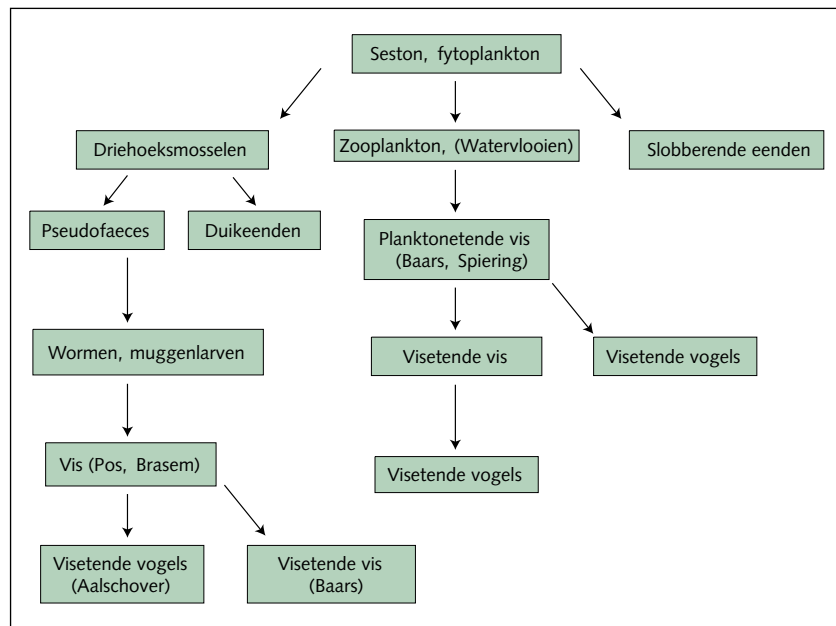
Vis-nr	Overleving (uren)	Aantal malen MC toegediend	Σ MC toegediend tot dood vis of einde proef (µg/ gr vis WW)	Uiterlijk lever na blootstelling	MC-gehalte lever (µg/ gr vis WW)	Afzonderlijke HPLC-pieken , met genormeerde retentietijden (min)														
						MC-1 µg/g WW	MC-2 µg/g WW	MC-3 µg/g WW	MC-4 µg/g WW	MC-5 µg/g WW	MC-6 µg/g WW	MC-7 µg/g WW	MC-8 µg/g WW	MC-9 µg/g WW	MC-10 µg/g WW					
Dosis 0 - 0,0 µg MC-LR / gr vis WW elke 12 uur																				
7	72	6	0	normaal	< det	< 3,3														
9	96	8	0	normaal	110	13,8	47,9	48,1	< 5											
12	48	4	0	normaal	75	30,3 min	33,2 min	34,2 min	-											
						25,4	49,9	< 5,6												
						31,6 min	34,2 min	-												
Dosis 3 - 1,0 µg MC-LR / gr vis WW elke 12 uur																				
25	84	7	7	normaal	216	10,9	30,0	44,5	40,2	66,2	23,9	< 1,5								
26	96	8	8	normaal	218	22,6 min	29,3 min	31,5 min	32,4 min	35,1 min	35,6 min	-								
29	96	8	8	normaal	36	9,7	7,1	35,4	36,7	28,5	17,3	45,3	37,9	< 0,8						
						22,6 min	24,5 min	29,6 min	31,9 min	32,8 min	33,4 min	35,6 min	36,2 min	-						
						36,0	< 1,6													
						36,5 min	-													
Dosis 4 - 3,3 µg MC-LR / gr vis WW elke 12 uur																				
31	72	6	20	normaal	340	5,7	44,9	13,5	42,4	47,8	33,7	82,5	69,6	< 2,2						
34	48	4	13	lichtbruin	192	29,3 min	30,2 min	32,1 min	32,6 min	33,6 min	34,2 min	36,5 min	37,1 min	-						
35	12	1	3	helderrood, deels vergroot	135	4,8	7,0	6,8	10,0	30,2	33,6	31,4	10,1	39,6	18,1					
36	96	8	26	erg rode lever	45	24,4 min	24,9 min	25,8 min	26,2 min	30,4 min	32,9 min	33,9 min	34,5 min	37 min	37,5 min					
						25,4	4,8	10,4	28,8	65,3	< 1,3									
						22,9 min	26,4 min	29,3 min	33,3 min	37,4 min	-									
						32,9	12,3	< 3,2												
						23,1 min	37,9 min	-												
Dosis 5 - 9,6 µg MC-LR / gr vis WW elke 12 uur																				
37	60	5	48	normaal	215	10,9	33,6	50,2	16,6	71,1	32,3	< 1,9								
38	48	4	38	normaal	86	33,4 min	33,9 min	34,9 min	35,6 min	38,2 min	38,7 min	-								
39	48	4	38	normaal	58	28,1	32,3	25,6	< 1,5											
40	48	4	38	normaal	34	23,4 min	38,6 min	39 min	-											
42	48	4	38	normaal	32	10,6	4,3	20,4	22,6	< 1,2										
						23,6 min	36,2 min	38,9 min	39,4 min	-										
						28,7	5,0	< 1,8												
						23,8 min	39,3 min	-												
						31,6	< 1,4	< 1,4												
						24 min	40,1 min	-												

3.3 Accumulatie en bioaccumulatie

Wanneer met het voedsel opgenomen toxines niet volledig worden uitgescheiden of afgebroken, kunnen ze accumuleren in het organisme en verder worden doorgegeven in de voedselketen.

Bioaccumulatie wordt gezien als het opstapelen van een specifieke substantie vanuit de leefomgeving in het lichaam van een levend organisme. Een stof accumuleert als het sneller wordt opgenomen en opgeborgen dan afgebroken of uitgescheiden. Biomagnificatie betekent de verhoging van de concentratie van een substantie, als die van de ene trofielaag naar de volgende wordt doorgegeven. Daarbij is er een onderscheid tussen de planktonische voedselketen via zoöplankton en de benthische voedselketen via driehoeksmosselen, pseudofaeces, wormen etc. (figuur 3.15).

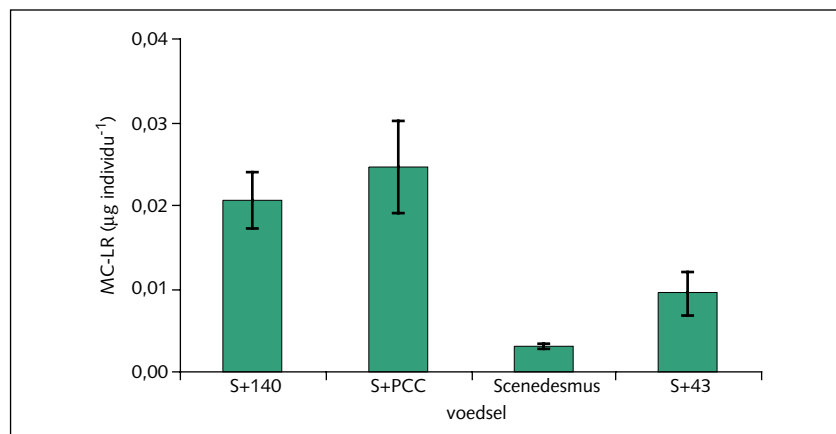
Figuur 3.15
Mogelijke doorgiftroutes van microcystine in het voedselweb



Daphnia

Daphnia die gedurende 7 dagen werd blootgesteld aan toxische *Microcystis*, accumuleerde een geringe mate aan microcystine (figuur 3.16). Daarbij is er geen onderscheid tussen blootstelling aan de minder toxische stam CYA140 of sterker toxische PCC7820. De geringe hoeveelheid microcystine in de *Scenedesmus* & CYA43 behandeling is waarschijnlijk afkomstig uit het IJsselmeer seston dat werd gebruikt in de graasproef.

Figuur 3.16
Microcystine-LR concentraties ($\mu\text{g Daphnia}^{-1}$) in *Daphnia* na een week blootstelling aan diverse voedselcondities: i) *Scenedesmus*; ii) *Scenedesmus* + CYA140; iii) *Scenedesmus* + PCC7820 en *Scenedesmus* + CYA43 (niet toxisch)



De sterk toxische *Microcystis*-stam PCC7820 werd door *Daphnia* zelfs in aanwezigheid van een alternatieve voedselalg gegeten. Er waren geen aanwijzingen dat toxine in het weefsel werd opgeslagen, het microcystine gehalte van *Daphnia* kan geheel verklaard worden uit microcystines in de algen die de darm vulden.

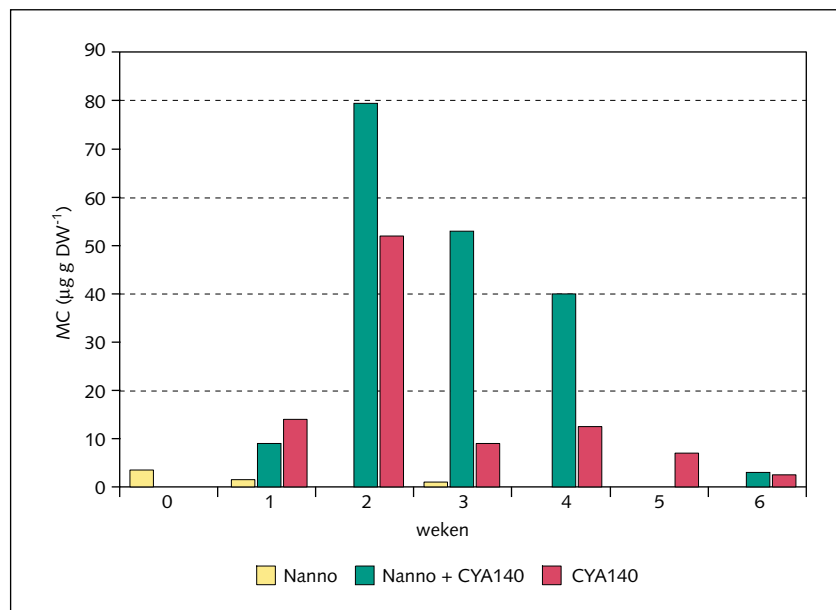
Het door *Daphnia* begraasde deeltjesgebonden microcystine kwam bijna geheel weer vrij in de vorm van opgelost microcystine. Een dergelijke effectieve omzetting van deeltjes-microcystine naar opgelost microcystine kan als een beschermingsmechanisme tegen blootstelling van zoöplankton aan microcystine worden gezien, aangezien opgelost microcystine niet begraasd wordt.

Dreissena

In 2002 werden de mosselen gedurende 3 weken blootgesteld aan een drietal verschillende voedselcondities: i) groenalg *Nannochloropsis*; ii) toxische *Microcystis* CYA140 en iii) mengsel CYA140 en groenalg. Daarna werden de mosselen overgezet op groenalgen. De hoeveelheid microcystine die wordt opgenomen in de mosselen in de eerste 3 weken en wordt uitgescheiden in week 4 - 6 wordt getoond in figuur 3.17. Het microcystine gehalte in de behandelingen met CYA140 bereikt een piek in week 2 en daalt al in week 3, dus terwijl de mosselen nog worden blootgesteld aan microcystine. Na overzetten van de mosselen op schoon groenwier voedsel verdwijnt microcystine redelijk snel uit de mosselen. Na 2 weken is er vrijwel niets meer meetbaar.

Figuur 3.17

Microcystine-LR ($\mu\text{g/g DW}$) accumulatie in IJsselmeer mosselen (t/m week 3) en het verdwijnen daarvan (week 4 - 6) bij groenalgen voedsel



Ook bij begrazing van de toxische *Microcystis* PCC7820 door *Dreissena* kon een verhoging van het microcystine gehalte in de mosselen worden aangetoond, maar nu alleen in voedselsuspensies waarin een non-toxisch alternatief ontbrak. Het door de mossel opgenomen toxine leek, anders dan bij *Daphnia*, niet alleen in de darminhoud maar ook in het mosselweefsel terecht te komen. De microcystine accumulatie was ook hier niet permanent. Na een verblijf van twee weken in non-toxisch voedsel waren de mosselen weer toxinevrij. Er werd geen significant verhoogde mortaliteit bij de blootgestelde mosselen vastgesteld.

Dreissena kan verzamelde ongewenste voedseldeeltjes vóór opname in de darm verwijderen door het produceren van pseudofaeces, een slijmachtige substanties met overtollig materiaal. Dit proces zou kunnen verklaren dat toxische *Microcystis*-cellen in aanwezigheid van non-toxische voedseldeeltjes wel werden begraasd, maar niet, of althans in mindere mate, tot microcystine accumulatie in de mossel leidden. Uitscheiding van cyanobacteriën in pseudofaeces zou tot een toxinetransport naar de benthische voedselketen leiden. Een dergelijk mechanisme kon echter niet worden bevestigd: in de dagelijks verwijderde detritus, waarin ook de pseudofaeces terecht komen, werd nauwelijks microcystine gevonden.

Vis

In figuur 3.18 is het verloop van de raai-gemiddelde microcystine gehalten van fytoplankton, zoöplankton, mosselen en vislevers weergegeven. Microcystine gehalten van grazende organismen die boven het gehalte van het fytoplankton uitkomen kunnen als aanwijzing voor bioaccumulatie worden beschouwd. De individuele metingen wijzen niet op bioaccumulatie van microcystines. Slechts één keer wordt in grazers een hoger microcystine gehalte gemeten dan in het fytoplankton: op 10 augustus 1998 bevat het zoöplankton op de zuidraai gemiddeld 173 µg microcystine/g AFDW, en het fytoplankton 136 µg microcystine/g AFDW.

Opvallend is de relatief geringe accumulatie in de mosselen, en de in vergelijking met het fytoplankton hoge microcystine gehalten van Spieringlevers. Er komen geen waarden > 100% voor, dus deze berekening levert geen aanwijzingen op voor het optreden van bioaccumulatie van microcystines.

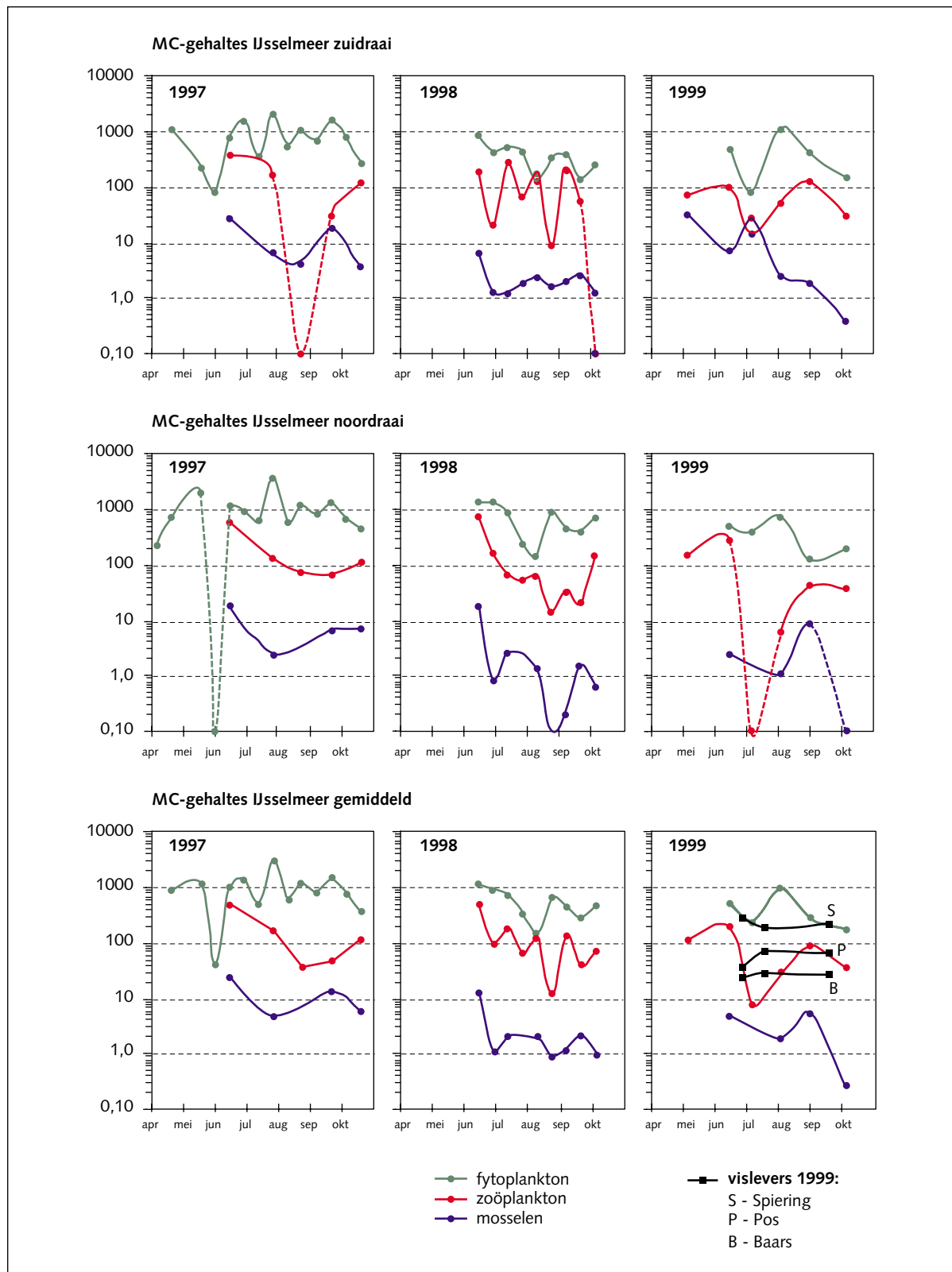
Conclusies: Een situatie zonder non-toxische voedseldeeltjes zal in het veld zelden voorkomen. Ook in aanwezigheid van non-toxische deeltjes worden de toxische cyanobacteriën uit het water verwijderd. Cyanobacteriën die het sterk toxische microcystine-LR bevatten worden door *Dreissena* begraasd wat, in afwezigheid van non-toxische voedseldeeltjes, tot korte termijn microcystine-accumulatie in de mossel leidt. Dit betekent dat deze toxines via de mosselen kunnen worden doorgegeven naar hogere trofie-niveau's.

Er waren echter geen aanwijzingen voor bioaccumulatie van microcystines: slechts één keer wordt in grazers een hoger microcystine gehalte gemeten dan in het fytoplankton. Het door *Daphnia* opgenomen microcystine kwam bijna geheel weer vrij in de vorm van opgelost microcystine. De microcystine accumulatie in *Dreissena* was niet permanent. Na een verblijf van twee weken in non-toxisch voedsel waren de mosselen weer toxinevrij. Daarom zouden duikenden die tijdens de winter driehoeksmosselen eten, geen gevaar lopen.

Slechts in een geval kon biomagnificatie worden vastgesteld: in 1999 waren de microcystine gehalten hoger in Spiering dan in hun voedsel zoöplankton.

Figuur 3.18

Verloop van de microcystine gehalten ($\mu\text{g MC/g AFDW}$) in verschillende componenten van het voedselweb in het IJsselmeer. Waarden onder de detectiegrens zijn op de x-as geplot



3.4 Effecten van cyanobacteriën & toxines op *Daphnia*, *Dreissena* en vis

3.4.1 Groei en reproductie van *Daphnia* bij natuurlijke & experimentele voedselcondities

3.4.1.1 Groei

Groei, ontwikkelingssnelheid en populatiedynamische parameters zoals reproductie van *Daphnia* zijn gemeten met natuurlijk IJsselmeer- en Markermeer-seston ("life history" experimenten).

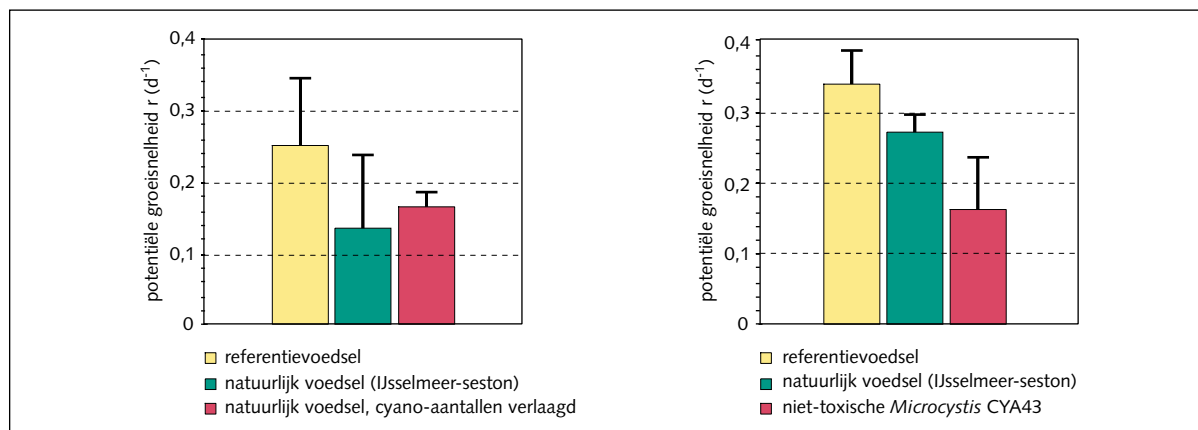
De voedselomstandigheden hadden weinig invloed op de ontwikkelingsnelheid van *Daphnia*. Zowel bij de IJsselmeer-*Daphnia*'s als bij de Markermeer-*Daphnia*'s duurde het juveniele stadium met natuurlijk voedsel wat langer dan met referentie voedsel bestaande uit groenalgen. In de adulte stadia waren de verschillen klein en niet significant.

De voedselomstandigheden hadden echter een duidelijke invloed op de lengtegroei van *Daphnia*. De dieren met natuurlijk voedsel bleven duidelijk kleiner dan met referentievoedsel. De lengtetoeename per dag was zowel op IJsselmeer- als op Markermeer-dieet in alle stadia lager dan met referentievoedsel. Met IJsselmeer-seston als voedsel groeiden de dieren nauwelijks meer in de adulte stadia 3 en 4. Verlaging van de cyanobacterie-aantallen door het verwijderen van de drijfslag had geen effect op de lengtegroei. Met niet-toxische *Microcystis* als voedsel was de juveniele lengtegroei vergelijkbaar met de lengtegroei met natuurlijk voedsel. De adulte dieren groeiden echter nauwelijks meer met niet-toxische *Microcystis* als voedsel.

Uit de gemeten ontwikkelingsduur, clutch size en het percentage niet-ontwikkende eieren is de potentiële groeisnelheid r van de *Daphnia* populatie in IJsselmeer en Markermeer berekend. Deze grootheid geeft de specifieke toenamesnelheid van een *Daphnia* populatie waarin clutch size en ontwikkelingsduur gedurende enige generaties constant op de gemeten waarden blijven, in afwezigheid van predatie en andere verliesposten. De potentiële groeisnelheid van *Daphnia* was met natuurlijk voedsel zowel in IJsselmeer als Markermeer zo'n 30% lager dan met referentievoedsel. Dit wijst er op dat de voedselomstandigheden niet optimaal waren. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn de aanwezigheid van cyanobacteriën, een overmaat aan voedselarme non-fytoplankton deeltjes, of onvoldoende voedsel in de goed begraasbare fytoplanktonfractie. Overigens was de geschatte populatie-groeisnelheid op natuurlijk voedsel van rond $0,2 \text{ d}^{-1}$ nog wel zo hoog, dat predatie en andere in dit experiment afwezige verliesfactoren belangrijke sturende factoren moeten zijn voor de *Daphnia*-populatie in IJsselmeer en Markermeer.

Figuur 3.19

Potentiële groeisnelheid van *Daphnia* met natuurlijk voedsel, referentievoedsel en gemanipuleerd voedsel. Met 95% betrouwbaarheidsintervallen



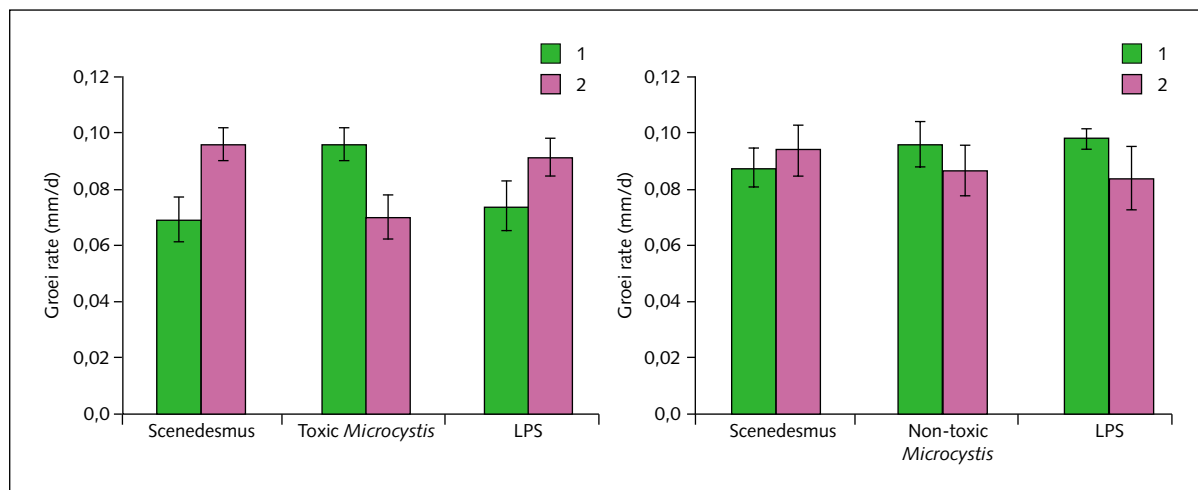
In een tweede experiment werd het aantal cyanobacteriën verlaagd, wat in een verhoogde potentiële groeisnelheid resulteerde in vergelijking met natuurlijk seston als voedselbron, maar het verschil is niet significant (figuur 3.19). Met niet-toxische *Microcystis* als voedsel was de potentiële groeisnelheid gehalveerd ten opzichte van de groei op referentievoedsel.

In een door het NIOO-CL uitgevoerde "life history" experiment werd de invloed van de voedselkwaliteit, a) sterk en niet sterk toxische *Microcystis*, b) aanwezigheid van referentievoedsel *Scenedesmus* en c) LPS (lipopolysaccharide, wat remmend zou werken op detoxicatie van microcystines) onderzocht. De belangrijkste uitkomsten waren (figuur 3.20):

1. De effecten van toxische *Microcystis* op overleving en groei van juveniele *Daphnia* zijn stamafhankelijk. De negatieve effecten zijn veel sterker met de hoog toxische stam PCC7820 dan met de minder toxische stam CYA140. De groeisnelheid in aanwezigheid van de sterk toxische stam PCC7820 is lager dan bij de aanwezigheid van de lager toxische stam CYA140. Beide stammen bevatten overigens de sterk toxische variant microcystine-LR als dominant microcystine.
2. Daarentegen biedt een hoge dosis hoogwaardig voedsel wel bescherming tegen een lage dosis PCC7820: de mortaliteit daalt vrijwel tot nul en de groeisnelheid stijgt sterk. Bij een lage dosis *Scenedesmus* heeft ook een lage dosis toxische *Microcystis* duidelijk negatieve effecten op *Daphnia*. Een goede conditie biedt bescherming tegen een lage blootstelling aan toxische *Microcystis*, niet tegen een hoge blootstelling.
3. De conditie van *Daphnia* in het IJsselmeer is suboptimaal, waarschijnlijk als gevolg van de samenstelling van het seston, met in de zomer een hoog aandeel cyanobacteriën in het fytoplankton. In overeenstemming hiermee leidde het toevoegen van PCC7820 aan IJsselmeer seston tot sterfte van *Daphnia* in proeven van AquaSense.

Figuur 3.20

Resultaten van het life-history experiment. *Scenedesmus* in een hoge dosis (2, paars) verhoogt de groeisnelheid ten opzichte van een lage dosis (1, groen). Toxische *Microcystis* heeft het omgekeerde effect op groeisnelheid (een hoge dosis remt). Niet toxische *Microcystis* heeft geen significant effect op groei van *Daphnia*. LPS heeft geen significant effect



3.4.1.2 Ei-productie

De voedselomstandigheden hadden een duidelijke invloed op de ei-productie van *Daphnia*. Met natuurlijk seston als voedsel werden in alle stadia minder eieren geproduceerd dan met referentievoedsel.

Met IJsselmeer- en Markermeer-seston als voedselbron werden in de eerste vier adulte stadia gemiddeld 43% respectievelijk 55% minder eieren geproduceerd. De ei-productie in IJsselmeerwater met verlaagde cyanobacterie-aantallen was lager, maar niet significant verschillend van de ei-productie met natuurlijk IJsselmeer-seston.

Met niet-toxische *Microcystis* als voedsel werden veel minder eieren geproduceerd dan met referentie- of natuurlijk voedsel. Om na te gaan of er aanwijzingen zijn voor negatieve effecten van microcystines op de reproductie van *Daphnia* in het IJsselmeer, zijn in 1997 en 1998 de ei-aantallen van *Daphnia* in het IJsselmeer gevolgd. Hieruit is de standaard egg production (SEP) berekend, het geïnterpoleerde aantal eieren in een dier van 1 mm lengde.

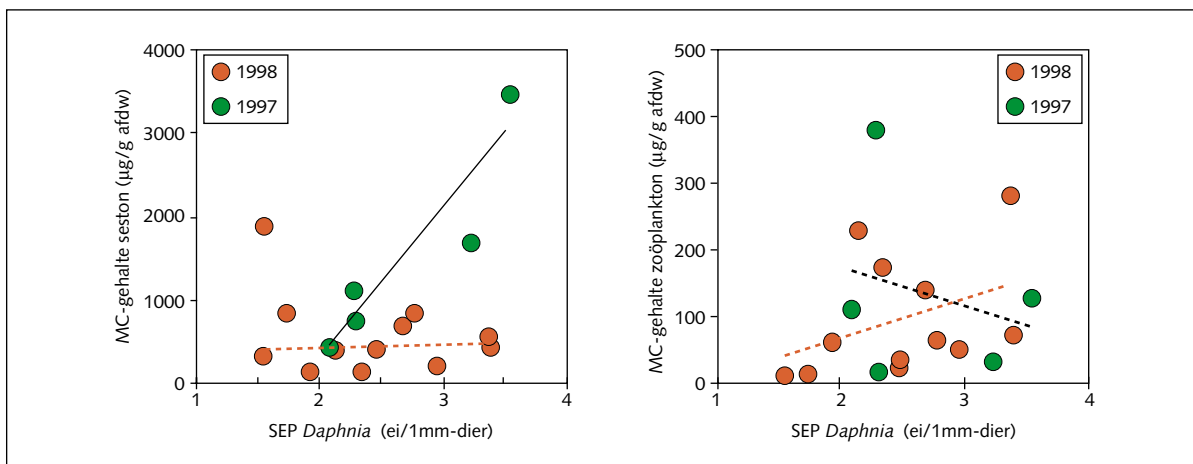
Met referentievoedsel en met Markermeer-seston als voedselbron ontwikkelden nagenoeg alle eieren (97 - 99%) zich tot newborns. Met IJsselmeer-seston als voedselbron was het gemiddelde percentage niet-ontwikkende eieren (12%) echter significant verhoogd. Aangezien er met referentie voedsel nauwelijks niet-ontwikkende eieren voorkwamen lijkt het erop dat eigenschappen van voedseldeeltjes in het IJsselmeer-seston de ontwikkeling van *Daphnia* negatief beïnvloedden.

In figuur 3.21 is van alle monsterdatums de per raai gemiddelde SEP-waarde uitgezet tegen het gemiddelde microcystine gehalte van het seston als maat voor de toxine-inhoud van het voedsel (links), en tegen het gemiddelde microcystine gehalte van het zoöplankton als maat voor het microcystine gehalte van *Daphnia* (rechts).

Er worden geen negatieve effecten van het seston-microcystine gehalte op de SEP gevonden. In 1997 wordt een significant *positief* effect van het microcystine gehalte in het voedsel gevonden. In 1997 is er een negatieve relatie tussen zoöplankton microcystine gehalte en *Daphnia*-SEP, die echter niet significant is. De SEP metingen leveren dus geen concrete aanwijzingen op voor negatieve effecten van microcystine op de reproductie van *Daphnia* in het IJsselmeer.

Figuur 3.21

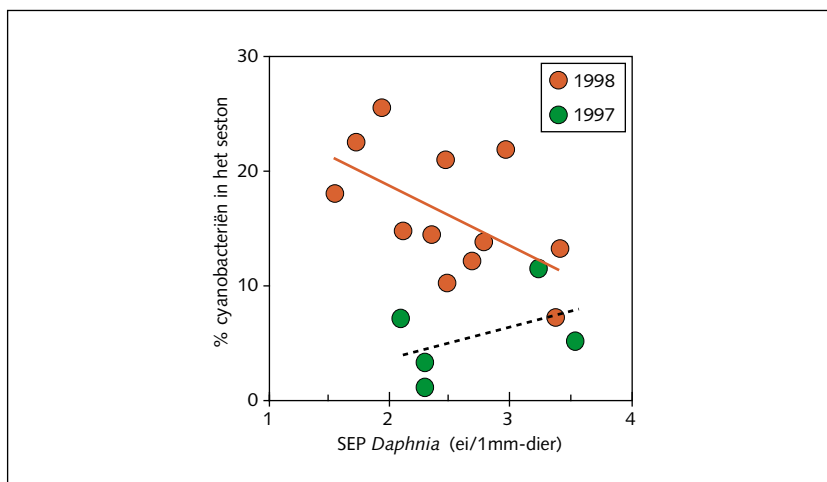
Standard Egg Production van *Daphnia* uitgezet tegen het microcystine gehalte van het seston (links) en van het zoöplankton (rechts). SEP-waarden berekend uit minder dan 15 waarnemingen zijn niet ingetekend. Niet-significante regressielijnen zijn onderbroken weergegeven



In figuur 3.22 is van alle monsterdatums de per raai gemiddelde SEP-waarde uitgezet tegen het percentage cyanobacteriën in het voedsel. Tussen SEP en percentage cyanobacteriën in het voedsel wordt in 1998 wél een significante negatieve relatie gevonden. De negatieve correlatie tussen percentage

cyanobacteriën en SEP is een aanwijzing voor negatieve effecten van cyanobacteriën op de reproductie van zoöplankton in het IJsselmeer in 1998. Dat er geen relatie is met het microcystine gehalte van het voedsel kan verband houden met variaties in het type microcystine, en dus van de toxiciteit gedurende de monsterperiode. Een andere verklaring kan zijn dat niet de toxineproductie, maar andere voedselkwaliteits-aspecten van de cyanobacteriën, zoals voedingswaarde of begraasbaarheid, de reproductie van *Daphnia* negatief beïnvloeden.

Figuur 3.22
Standard Egg Production van *Daphnia* uitgezet tegen het percentage cyanobacteriën in het voedsel. SEP-waarden berekend uit minder dan 15 waarnemingen zijn niet ingetekend. Niet-significante regressielijnen zijn onderbroken weergegeven



Bij alle voedselomstandigheden werden soms niet-ontwikkende eieren waargenomen. Het percentage niet-ontwikkende eieren was het hoogst in adult stadium 2.

3.4.1.3 Mortaliteit

Er zijn geen aanwijzingen voor een door voedsel factoren veroorzaakte verhoogde mortaliteit met IJsselmeer- of Markermeer-seston als voedselbron. Met IJsselmeer-seston stierven bij natuurlijk voedsel en bij referentievoedsel elk 3 van de 20 dieren tijdens de 20 dagen durende proef en met Markermeer-seston stierven 2 van de 20 dieren met natuurlijk voedsel en 1 van de 20 dieren met referentievoedsel.

Wel is natuurlijk seston uit IJsselmeer en Markermeer geen optimale voedselbron voor *Daphnia*. Schattingen van de C-inhoud van het natuurlijke seston gaven aan dat er waarschijnlijk geen voedselgebrek voor *Daphnia* was in IJsselmeer of Markermeer.

De microcystine concentraties in het natuurlijke IJsselmeer-seston liggen met gemiddelden van 2,8 - 17 µg microcystine/l aanzienlijk boven het niveau waarbij in de literatuur negatieve effecten op *Daphnia* worden gemeld (0,1 µg microcystine/l). Microcystine uit de zeer toxische *Microcystis* PCC7820 had een veel sterker effect op *Daphnia* dan de microcystine uit de minder toxische stam CYA140 (tabel 3.3, kolom 4 resp. 3). Opvallend is vooral de hoge sterfte in buis 11A, waarin veel *Scenedesmus* en geen toxische *Microcystis* aanwezig is. In het duplo experiment is de sterfte in deze behandeling dan ook nul. De aanwezigheid van voldoende hoogwaardig voedsel lijkt slechts in zeer geringe mate bescherming te bieden tegen PCC7820. Anders is dit bij een lage dosis toxische *Microcystis*: hier biedt voldoende *Scenedesmus* duidelijk bescherming tegen het microcystine. De sterfte is miniem en de groeisnelheid hoger. Bij een lage dosis groenalgvult de beschermende werking van het hoogwaardig voedsel tegen een lage dosis PCC7820. Bij een lage dosis *Scenedesmus* heeft ook een lage

dosis toxische *Microcystis* duidelijk negatieve effecten op *Daphnia*. Een goede conditie biedt bescherming tegen een lage blootstelling aan toxische *Microcystis*, niet tegen een hoge blootstelling. Het gebruik van LPS = lipopolysacharid en lijkt geen effect te hebben op de effecten van de toxische *Microcystis* op *Daphnia*.

Tabel 3.3

Sterfte van *Daphnia* in juveniele stadium in beide life-history experimenten (1: met CYA140) en (2: met PCC7820).
Legenda behandeling: S = *Scenedesmus*; T = Toxische *Microcystis*; N = Niet-toxische *Microcystis*; L = LPS; 1 = lage dosis; 2 = hoge dosis

Buis no.	Behandeling	exp. 1: dood voor volwassenheid [n]	exp. 2: dood voor volwassenheid [n]
1A	S2T2L2	0	4
1B		1	4
2A	S2T2L1	3	5
2B		2	4
3A	S2T1L2	0	0
3B		0	0
4A	S1T2L2	1	6
4B		1	6
5A	S2T1L1	0	0
5B		1	1
6A	S1T2L1	4	6
6B		2	4
7A	S1T1L2	1	6
7B		0	4
8A	S1T1L1	1	6
8B		1	6
9A	S2N2L2	0	0
9B		1	1
10A	S2N2L1	0	0
10B		0	0
11A	S2N1L2	6	1
11B		0	0
12A	S1N2L2	1	1
12B		0	2
13A	S2N1L1	1	2
13B		0	1
14A	S1N2L1	1	3
14B		0	4
15A	S1N1L2	3	3
15B		0	3
16A	S1N1L1	2	3
16B		1	5

De resultaten uit het experiment zouden kunnen betekenen, dat er in het IJsselmeer waarschijnlijk minder sterk toxische microcystines voorkomen. De identiteit van de IJsselmeer-microcystines is onbekend, maar het sterk toxische microcystine-LR, aanwezig in *Microcystis* PCC7820, wordt er zelden aangetroffen.

3.4.2 Mortaliteit bij *Dreissena*

Sterfte van de mosselen tijdens de experimenten was over het algemeen gering (< 5% in drie weken), en niet gerelateerd aan toxische voedselcondities (AquaSense 2002b). Alleen in 1997 was er een opmerkelijk hoge sterfte van 30% bij de mosselen in gemengd voedsel. Onderzoek uitgevoerd door het NIOO-CL (Dionisio Pires *et al.* 2003) laat zien, dat de overlevingsrate van *Dreissena* larven kleiner is na graas op toxische *Microcystis* dan op niet toxische *Microcystis*. Het voedseltype heeft blijkbaar meer invloed op larven dan adulte mosselen. *Dreissena* lijkt dus aanzienlijk minder gevoelig voor microcystine dan *Daphnia*, die enkele dagen bij vergelijkbare microcystineconcentraties niet overleefde. Cyanotoxines lijken in het algemeen niet erg toxisch te zijn voor mollusken (AquaSense 1996b). Dit kan te maken hebben met de feit dat bijvoorbeeld *Dreissena* in staat is, ongewenste voedseldeeltjes uit te scheiden als pseudofaeces.

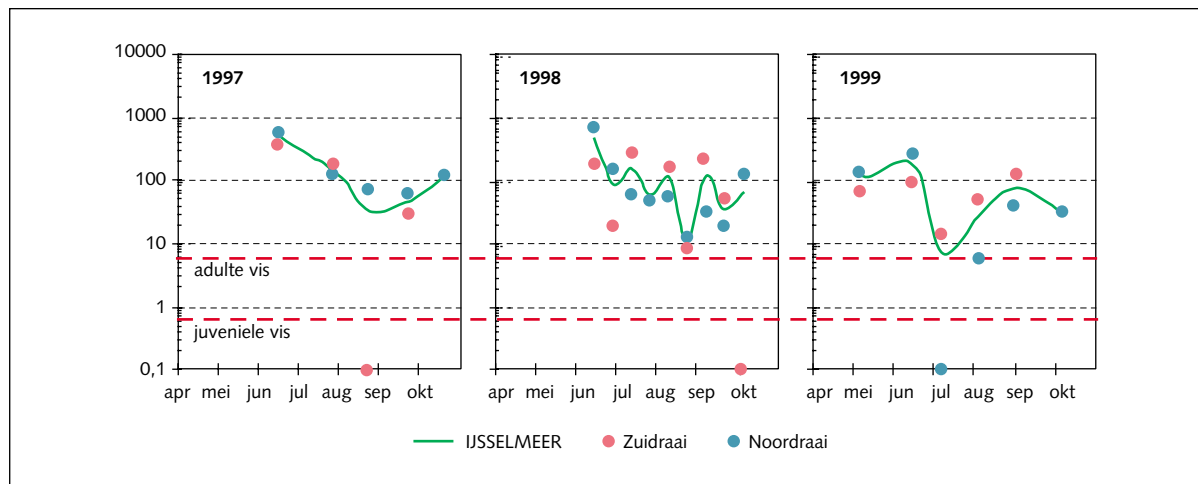
3.4.3 Effecten van microcystines op vis

Met de kennis van het dieet van vis in het IJsselmeer (Hartgens & Dekker 2000) en data afkomstig uit onderzoek van Tencalla *et al.* (1994) kan een schatting gemaakt worden van microcystine gehalten in zoöplankton die tot leverschade bij planktonetende vis kunnen leiden. Deze kritische zoöplankton microcystine gehalten bedragen voor juveniele en adulte vis respectievelijk 0,7 en 7 μg microcystine/g zoöplankton-dw. De waarden liggen voor juveniele vis lager dan voor adulte vis vanwege de hogere relatieve voedselopname van juvenielen (resp. 10% en 1% (dw/ww) per dag, AquaSense 1998).

De kritische zoöplankton microcystine-LR gehalten (rode stippellijn) waarboven leverschade bij adulte en juveniele Baars zou kunnen voorkomen zijn samen met de in het IJsselmeer gemeten waarden ingetekend (figuur 3.23). Volgens deze benadering zou voor planktivore vis "veilige" zoöplankton-MC gehalten maar zelden voorkomen in het IJsselmeer.

.....
Figuur 3.23

Microcystine gehalte van zoöplankton (μg microcystine/g afdw) op de zuid- en noordraai van het IJsselmeer. Nulwaarden zijn op de x-as geplott



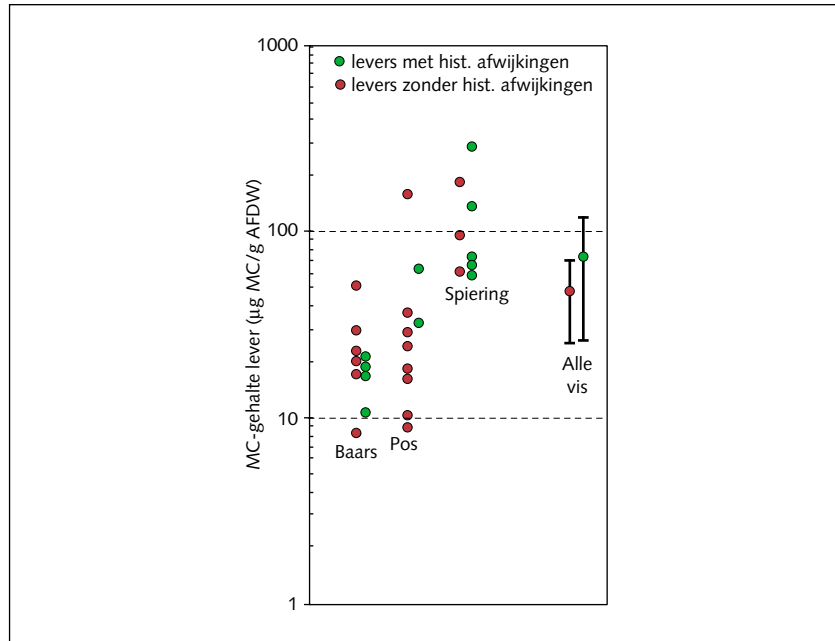
3.4.3.1 Histologische leverafwijkingen in het veld

In 37% van de levers werden histologische afwijkingen gevonden die door blootstelling aan microcystines kunnen zijn veroorzaakt. Dat was het geval bij 2 van de 12 Poslevers, 5 van de 12 Baarslevers en 6 van de 12 Spieringlevers. Vergrote of donkerrood gekleurde levers, zoals die werden waargenomen bij de vissen die experimenteel aan microcystine werden blootgesteld, kwamen bij de in het IJsselmeer gevangen vissen niet voor.

Er lijkt weinig relatie te zijn tussen het voorkomen van histologische afwijkingen en het microcystine gehalte van de levers (figuur 3.24). Zowel microcystinerijke levers zonder afwijkingen als microcystinearme levers met afwijkingen komen voor. Het gemiddelde microcystine gehalte van levers met histologische afwijkingen is hoger dan van levers zonder afwijkingen, maar dit verschil is niet significant.

Figuur 3.24

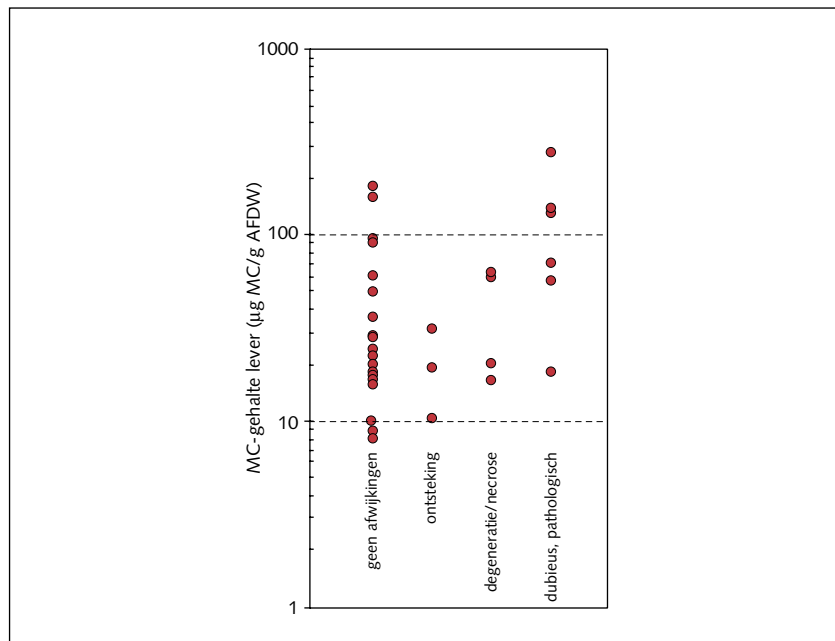
Microcystine gehalte van de vislevers waarop MC-analyse en histologisch onderzoek is verricht. MC-gehalten van histologisch afwijkende levers zijn rood weergegeven. Met 95% betrouwbaarheidsintervallen bij de gemiddelden



De histologische afwijkingen zijn in drie categorieën ondergebracht: ontstekingen, degeneratie/necrose en dubieuze pathologische afwijkingen. Van deze leverafwijkingen is niet bekend in hoeverre ze specifiek zijn voor acute of chronische blootstelling aan cyanotoxines, of ook door andere factoren veroorzaakt kunnen zijn. Geen van de afwijkingen is duidelijk gerelateerd aan levers met sterk verhoogde microcystine gehalten (figuur 3.25).

Figuur 3.25

Het microcystine gehalte van vislevers met verschillende histologische afwijkingen



3.4.3.2 Gevoeligheid van Baars voor geïnjecteerde microcystine

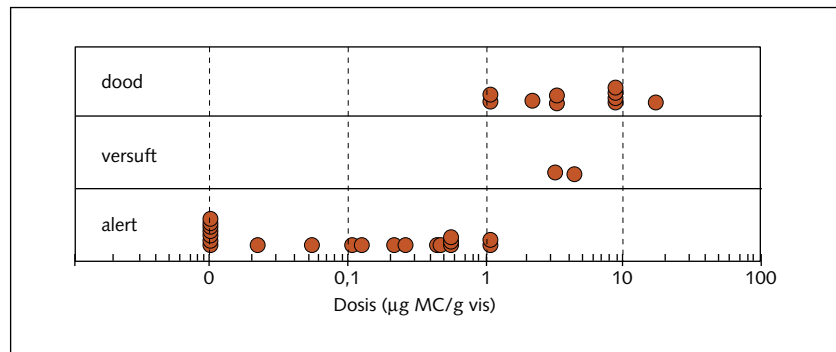
Om de relatie van leverschade en sterfte (LD_{50}) van vis en verschillende concentraties microcystine te onderzoeken werd microcystine in het laboratorium toegediend aan vis. In het veld werden de hoogste concentraties

microcystines in Spiering gemeten, maar deze vis is moeilijk onder experimentele condities te houden. Daarom werd het onderzoek uitgevoerd aan Baars en Pos.

Het effect van intra-peritoneaal (in de buikholte) ingespoten microcystine op Baars is onderzocht met een LD₅₀ experiment met 5 microcystine doses en drie vissen per dosis. Er is gekeken naar effecten op overleving en op uiterlijk, gewicht, histologische afwijkingen en microcystine gehalte van de lever.

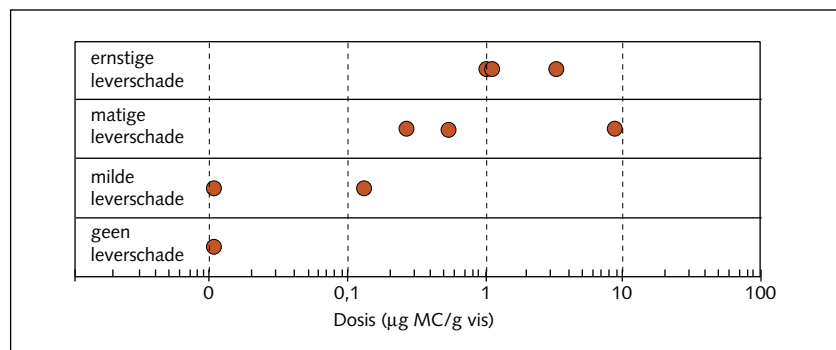
In figuur 3.26 is de overleving van de Baarzen bij de verschillende microcystine doses weergegeven. Bij doses tot 0,55 µg microcystine/g vis waren geen effecten waarneembaar. Bij doses rond 1 µg microcystine/g vis overleefde een deel van de vissen niet, bij doses boven 2,2 µg microcystine/g vis waren alle vissen 48 uur na de injectie versuft of dood.

Figuur 3.26
Sterfte van Baars bij toenemende doses i.p. geïnjecteerde microcystine-LR



In de meeste histologisch onderzochte levers werd milde, matige of ernstige degeneratie van levercellen met verlies van orgaanstructuur of lokale tot uitgebreide levernecrose vastgesteld. Dergelijke beschadigingen kunnen door intoxicatie veroorzaakt zijn. In figuur 3.27 is de mate van histologische schade aan de Baarslevers bij de verschillende microcystine doses weergegeven. Er is een duidelijke dosis-effect relatie. Maar het bleek dat ook in niet aan microcystine blootgestelde vissen milde leverschade voor kon komen. De milde leverschade die bij lage microcystine doses werd waargenomen kan dus ook andere oorzaken hebben dan blootstelling aan microcystine. Matige leverschade kwam voor bij microcystine doses vanaf 0,26 µg/g, ernstige leverschade vanaf 1,0 µg/g.

Figuur 3.27
Histologische schade aan Baarslevers bij toenemende doses intra-peritoneaal geïnjecteerde microcystine-LR



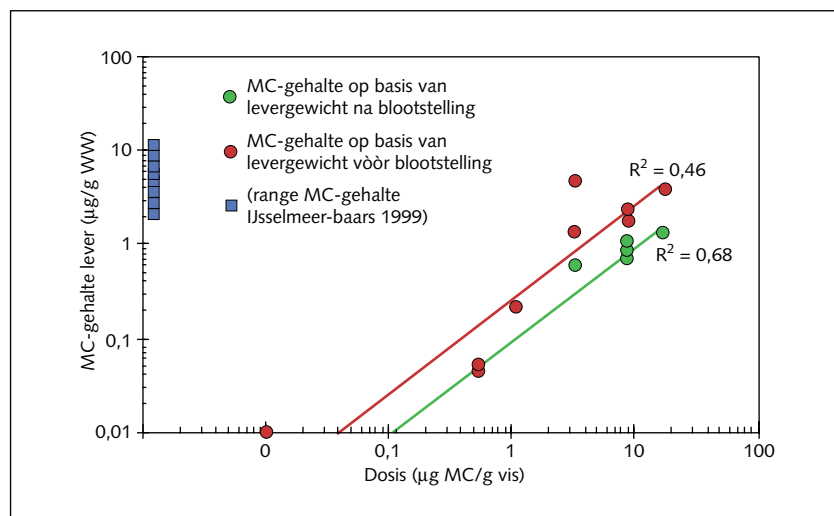
In figuur 3.28 is het microcystine gehalte van de Baarslevers bij de verschillende microcystine doses weergegeven. De opname van microcystine in de lever is in feite groter dan de toename van het microcystine gehalte suggereert, omdat de hogere doses ook tot een toename van het gewicht van de lever leidden. Daarom is in figuur 3.28 tevens een microcystine gehalte van de lever ingetekend berekend op basis van het levergewicht vóór de blootstelling aan microcystine.

In alle aan microcystine blootgestelde vissen werd een verhoging van het microcystine gehalte in de lever vastgesteld, tot maximaal 1,3 µg/g lever bij de hoogste dosis. Er is een significante dosis-effect correlatie. De in de lever aangetroffen microcystine bedroeg 0,1 - 1,1% van de toegediende hoeveelheid.

Ter vergelijking zijn microcystine gehalten van levers van IJsselmeer-Baars ingetekend. Microcystine gehalten die in dit experiment lethaal waren, blijken in het veld niet lethaal.

Figuur 3.28

Microcystine gehalte van Baarslevers bij toenemende doses intra-peritoneaal geïnjecteerde microcystine-LR. Ter vergelijking zijn MC-gehalten van in het IJsselmeer gevangen Baars ingetekend



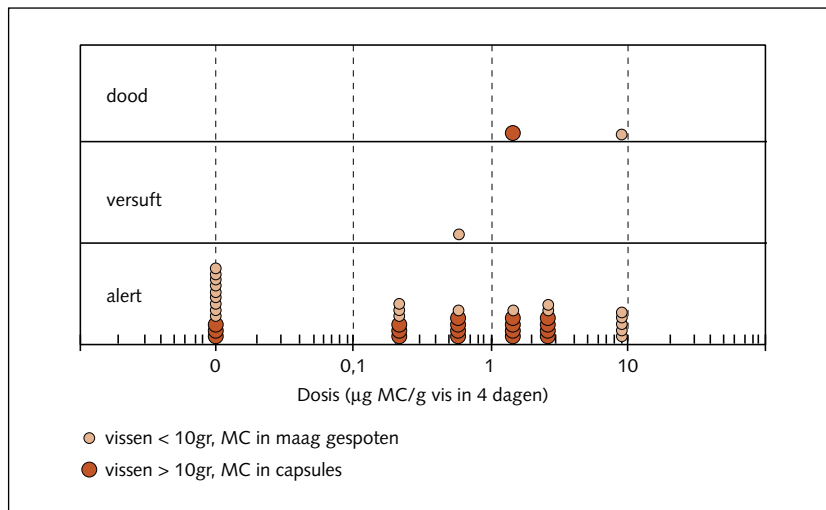
Dit zou op een lagere toxiciteit van de in het IJsselmeer voorkomende microcystines kunnen wijzen, maar het lijkt meer waarschijnlijk dat de verschillende wijze van blootstelling een rol speelt: een acute eenmalig geïnjecteerde blootstelling in het experiment, een langdurige blootstelling in het veld.

3.4.4 Gevoeligheid van Baars voor oraal toegediende microcystine

Om een betere vergelijking met de natuurlijke wijze van voedselopname te verkrijgen, werd microcystine ook oraal en over een langer tijdstip (acht gelijke porties verdeeld over vier dagen) toegediend. Het effect van oraal toegediende microcystine op Baars is onderzocht met zes microcystine doses en zes vissen per dosis. De metingen zijn in 2 fases uitgevoerd, eerst met de 4 laagste microcystine doses, enige tijd daarna met de hoogste dosis. Er is gekeken naar effecten op overleving en op uiterlijk, gewicht, histologische afwijkingen en microcystine gehalte van de lever. Kleinere vissen die minder dan 10 gr wogen verdroegen de capsules echter niet en kregen daarom microcystine in de maag ingespoten. De resultaten doen vermoeden dat de vissen bij deze toedieningsmethode wellicht blootstelling aan microcystine kunnen voorkomen of verminderen, bijvoorbeeld door de maag te legen. Daarom zijn in de figuren de kleinere vissen afzonderlijk weergegeven. Anders dan in de experimenten met geïnjecteerde microcystine trad weinig sterfte op (figuur 3.29). Slechts twee vissen overleefden de proef niet, één bij

de hoogste microcystine dosis en één bij de dosis van 1,5 µg microcystine/g. De eerste had echter vermoedelijk toxine in de buikholte gekregen bij het toedienen van microcystine. De tweede had een hoog microcystine gehalte in de lever en ernstige degeneratie van de levercellen. De laagste microcystine dosis met een lethaal effect (LOED) bij orale toediening was dus 1,5 µg/g vis (in 4 dagen).

Figuur 3.29
Sterfte van Baars bij toenemende doses
oraal toegediende microcystine-LR



Gezien de geringe sterfte lijkt de orale LD₅₀ waarde hoger te liggen dan de hoogste dosering van 9,2 µg microcystine-LR/g vis in 4 dagen. Bij de overleving bij de hoogste dosering kan echter meespelen dat het hier steeds kleine vissen betreft die vanwege de afwijkende toedieningsmethode wellicht microcystine blootstelling wisten te voorkomen. Een waarde van 2,65 µg microcystine-LR/g vis in 4 dagen lijkt daarom een betere schatting van de ondergrens van de LD₅₀ waarde bij orale toediening.

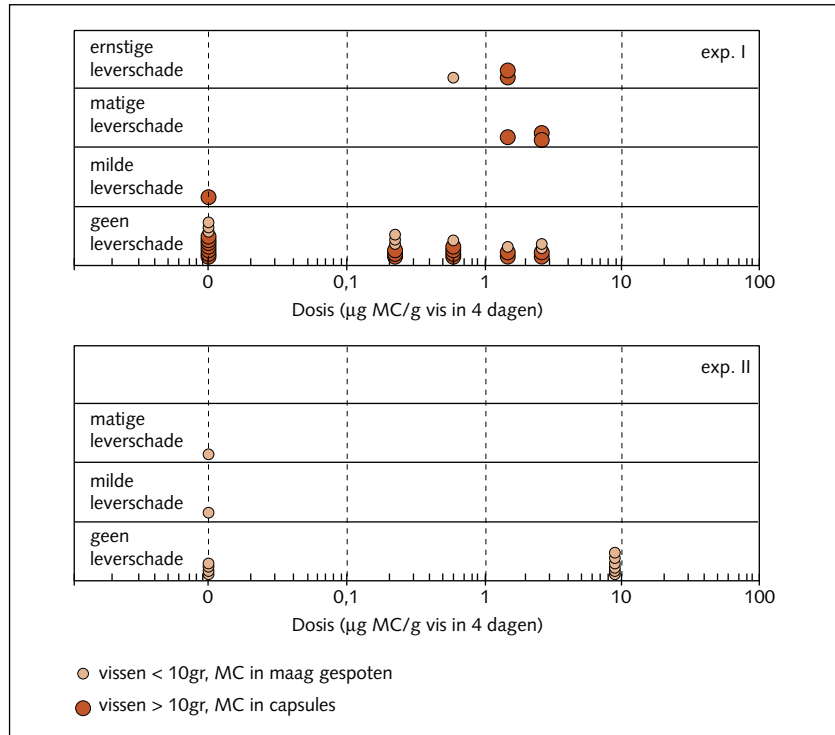
Anders dan in de experimenten met geïnjecteerde microcystine kwam vergroting en verkleuring van de lever bij oraal blootgestelde vissen slechts incidenteel voor. Bij het histologisch onderzoek werd in tien van de onderzochte Baarslevers een geringe tot ernstige degeneratie van levercellen vastgesteld met verlies van orgaanstructuur of ernstige lokale tot uitgebreide levernecrose. Daarnaast werden er leverafwijkingen vastgesteld die minder duidelijk aan de microcystine blootstelling zijn gerelateerd. Dergelijke symptomen kunnen het gevolg van artificiële veranderingen zijn of milde degeneratieve veranderingen representeren.

In figuur 3.30 is de mate van mogelijk door intoxicatie veroorzaakte histologische schade aan de Baarslevers bij de verschillende microcystine doses weergegeven, afzonderlijk voor het eerste experiment met de vier laagste doses en het tweede experiment met de hoogste dosis.

In het eerste experiment kwam in de met microcystinevrij voedsel behandelde controlegroep geen leverschade voor. Eén onbehandelde vis vertoonde milde degeneratie van de levercellen. Ernstiger leverschade werd waargenomen bij doses vanaf 0,6 µg microcystine/g vis. Bij alle doses kwamen ook vissen zonder leverschade voor. De ernstigste leverschade, en ook de meeste vissen met leverschade, werden bij 1,5 µg microcystine/g vis waargenomen, en niet bij de hoogste microcystine dosis. In het tweede experiment waarin de hoogste microcystine dosis werd onderzocht kwam bij de niet blootgestelde vissen milde en zelfs matige degeneratie van de levercellen voor.

Figuur 3.30

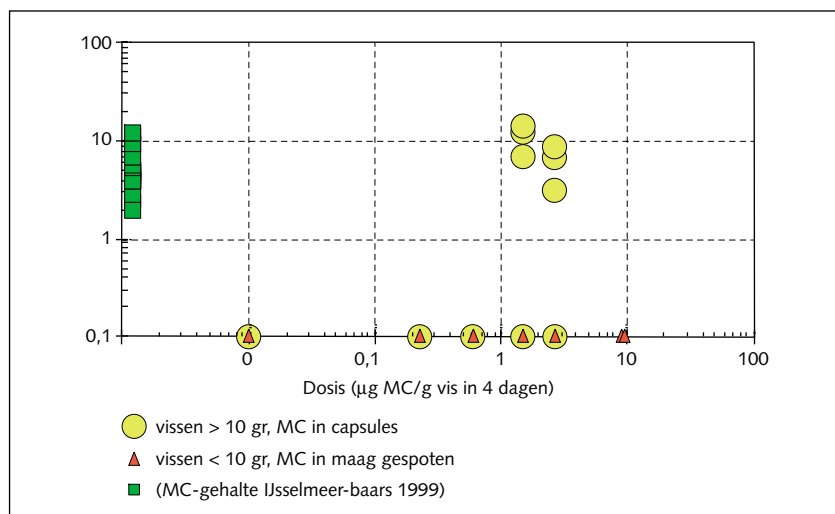
Mogelijk aan intoxicatie gerelateerde histologische schade aan Baarslevers na orale toediening van verschillende doses microcystine-LR



Bij geen van de zes aan microcystine blootgestelde vissen werd echter degeneratie van de levercellen vastgesteld. De afwezigheid van leverschade bij de hoogste microcystine dosis zou op een artefact kunnen duiden, omdat dit experiment geheel met kleine vissen is uitgevoerd, die vanwege de afwijkende toedieningsmethode wellicht microcystine blootstelling wisten te voorkomen. Ook bij de vissen in het eerste experiment die microcystine in de maag ingespoten kregen werd slechts éénmaal leverschade vastgesteld. In figuur 3.31 is het microcystine gehalte van de Baarslevers bij de verschillende orale microcystine doses weergegeven. Kleine vissen (< 10 gr) zijn met eigen symbolen aangegeven, hier niet alleen vanwege de afwijkende microcystine toediening, maar ook omdat voor deze vissen het detectieniveau van de microcystine bepaling in de grootte-orde van 5 µg/g ligt, aanzienlijk hoger dus dan de 0,1 µg/g lever die de figuur suggereert.

Figuur 3.31

Microcystine gehalte van Baarslevers bij toenemende doses oraal toegediende microcystine-LR. Ter vergelijking zijn MC-gehalten van in het IJsselmeer gevangen Baars ingetekend



De in de lever aangetroffen hoeveelheid microcystine bedroeg 0 - 16,5% van de toegediende hoeveelheid. Het microcystine gehalte van de levers was bij vergelijkbare doses hoger dan na toediening via injectie. Er was geen relatie met de dosis. Bij de twee laagste doses kon geen microcystine in de vislevers worden aangetoond. Bij doses van 1,5 en 2,65 µg microcystine/g vis werd in 3 van de 6 vislevers microcystine aangetroffen. Het hoogste microcystine gehalte kwam voor bij de dosis 1,5 µg microcystine/g vis en bedroeg 13,7 µg/g lever WW.

Bij orale toediening van microcystine, waarbij vergelijkbare doses zijn toegepast als bij de injecties, kwam nauwelijks mortaliteit maar wel verkleuring of vergroting van de levers voor. De gevoeligheid voor microcystine ligt bij orale opname dus veel lager dan bij injectie, zoals ook in proeven met muizen is gevonden (Falconer 1991, Kotak *et al.* 1993). Dat microcystine-LR ook bij orale opname schade toebrengt bleek uit het histologisch onderzoek van de vislevers: bij doses vanaf 0,6 µg microcystine/gr vis vertoonde een deel van de vissen matige of ernstige histologische leverschade.

3.4.5 Gevoeligheid van Pos voor oraal toegediende microcystine

Naast experimenten aan Baars werden ook experimenten aan Pos uitgevoerd. De data over overleving, de toegepaste microcystine doseringen en het uiterlijk van de vislevers na blootstelling aan microcystine van de 42 gebruikte proefdieren, zijn opgenomen in tabel 3.4. De tabel bevat ook de uitkomsten van de HPLC-metingen van het microcystine gehalte van 15 geselecteerde vislevers, en een histologische beschrijving van 12 geselecteerde levers. Er worden relatief hoge microcystine gehalten in de levers aangetroffen, met een maximale waarde van 340 µg microcystine/gr WW. Bij een eerder forced feeding experiment uitgevoerd met Baars was het hoogste lever microcystine gehalte 14 µg microcystine/gr lever WW. Hier waren de toegepaste microcystine doses ruwweg een factor 10 lager. In het IJsselmeer zijn in Poslevers microcystine gehalten tot 45 µg microcystine/gr lever WW gemeten (AquaSense 2002a en b).

Macroscopische leverafwijkingen kwamen voor bij één niet aan microcystine blootgestelde lever, en bij 3 levers die aan de op één na hoogste microcystine dosis waren blootgesteld, zie tabel 3.4. Bij de hoogste microcystinedosis werden geen afwijkingen aan uiterlijk of gewicht van de levers vastgesteld.

De beoordeling van de levers werd sterk bemoeilijkt door een algemeen optredend verlies van orgaanstructuur bij gelijktijdige slechte kleurbaarheid van de erythrocyten. Deze afwijkingen leken niet als pathologische necrotiserende veranderingen te kunnen worden beschouwd, het leek er op dat hier van artefacten sprake kon zijn. De aard van een mogelijk artefact bleef echter onduidelijk. Na interne controle bleek de wijze waarop de levermonsters behandeld en gefixeerd waren correct.

Deze afwijkingen waren bijzonder opvallend bij de drie laagste microcystine doses en maakten de interpretatie van bevindingen zoals vacuolisatie van levercellen in de resterende levers moeilijk. Op grond van de bovenbeschreven afwijkingen kon een dosis-effect relatie niet eenduidig worden aangetoond. Opvallend is wel dat in de hoogste dosisgroep lokale necrosehaardjes of necrose van enkele cellen worden gevonden. Vanwege de hoge niet aan microcystine gerelateerde uitval is de spreiding van de individuele overlevingen echter groot. Er kan dan ook geen significant effect van microcystine blootstelling op de sterfte worden vastgesteld. Ook het percentage nog levende vissen na 1, 2 en 3 dagen blootstelling aan microcystine-LR wijst op een verhoogde sterfte bij toenemende microcystine doses, maar ook voor deze parameter zijn de dosis-effect relaties niet significant vanwege de grote spreiding.

Tabel 3.4

Analyseresultaten van de orale toediening van microcystine-LR aan Pos

Vis-Id	Sexe	Lengte (cm)	Gewicht (gr)	Levergewicht (gr)	Overlevings (dagen)	Aantal maalen MC toegedend	Σ MC toegedend tot dood vis of einde proef ($\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis}$)	MC-gehalte lever (HPLC) ($\mu\text{g MC} / \text{gr WW}$)	Uiterlijk lever na blootstelling	Vis-Id	Beschrijving histologische bevindingen (2 vissen per dosis)
Vóór blootstelling aan MC											
1	man	9,3	9,8	0,07	-	0	0				normaal
2	vrouw	10,2	13,7	0,13	-	0	0				normaal
3	man	8,2	6,6	0,12	-	0	0				normaal
4	vrouw	9,6	12,9	0,22	-	0	0				normaal
5	vrouw	10,7	14,3	0,21	-	0	0				normaal
6	vrouw	9,8	10,7	0,14	-	0	0				normaal
Dosis 0 - 0,0 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
7	vrouw	9,4	10,4	0,19	3	6	0	< det		7	Vis 7: algemeen verlies van leverstructuur, cellen liggen los en niet in celverband, de aanwezige erythrocyten relatief kleurloos, geen ontstekingscelreactie
8	vrouw	11,5	21,7	0,35	1	1	0		geel/lichtbruin		
9	vrouw	8,7	7,7	0,15	4	8	0	110	normaal		
10	vrouw	10,8	14,0	0,16	2	3	0		normaal	11	Vis 11: multifocaal verlies van leverstructuur, cellen liggen los en niet in celverband, daarnaast veel levercellen met matige vacuolisatie, geen ontstekingscelreactie, de aanwezige erythrocyten relatief kleurloos
11	vrouw	10,2	13,1	0,20	4	8	0		normaal		
12	vrouw	10,1	10,9	0,10	2	4	0	75	normaal		
Dosis 1 - 0,12 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
13	vrouw	10,2	13,1	0,20	1	2	0		normaal	14	Vis 14: Diffuus sterke vacuolisatie van levercellen deels fijnvacuolair, deels met grote vacuoles
14	man	10,4	14,8	0,23	4	8	1		normaal		
15	vrouw	11,5	17,8	0,23	3	6	1		normaal		
16	vrouw	8,6	8,1	0,11	3	6	1		normaal	15	Vis 15: Multifocaal verlies van leverstructuur, multifocale enkele necrosehaardjes
17	man	8,8	8,3	0,17	2	3	0		normaal		
18	vrouw	10,5	13,9	0,23	3	5	1		normaal		
Dosis 2 - 0,44 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
19	man	9,1	7,5	0,11	3	5	2		normaal	20	Vis 20: Levercelstructuren matig aangekleurd, daarnaast diffuse matige vacuolisatie van levercellen
20	vrouw	9,8	10,9	0,16	3	6	3		normaal		
21	vrouw	11,0	15,6	0,18	3	5	2		normaal	21	Vis 21: algemeen verlies van leverstructuur, cellen liggen los en niet in celverband, de aanwezige erythrocyten m.n. in het midden van het weefsel relatief kleurloos
22	vrouw	9,5	10,3	0,13	2	4	2		normaal		
23	man	9,1	8,3	0,12	2	3	1		normaal		
24	vrouw	8,3	8,3	0,07	3	5	2		normaal		
Dosis 3 - 1,0 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
25	vrouw	10,0	12,3	0,18	4	7	7	216	normaal	26	Vis 26: matige diffuse vacuolisatie van levercellen, erythrocyten slecht kleurbaar
26	vrouw	10,9	15,8	0,32	4	8	8	218	normaal		
27	vrouw	9,5	11,2	0,17	2	4	4		normaal		
28	vrouw	11,1	15,6	0,22	3	6	6		normaal	29	Vis 29: diffuse matige vacuolisatie van levercellen, in enkele levercellen hyaline ophopingen, daarnaast slecht kleurbare erythrocyten m.n. in het midden van het weefsel
29	vrouw	10,3	13,7	0,19	4	8	8	36	normaal		
30	vrouw	9,0	8,7	0,15	3	6	6		normaal		
Dosis 2 - 0,44 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
31	vrouw	9,1	9,1	0,138	3	6	20	340	normaal	31	Vis 31: diffuse, matige tot sterke vacuolisatie van levercellen, deels fijnvacuolair, deels met grote vacuoles
32	vrouw	9,7	11,6	0,158	1	2	7		normaal		
33	vrouw	10,0	12,4	0,151	1	2	7		normaal		
34	vrouw	10,6	16,3	0,298	2	4	13	192	lichtbruin	36	Vis 36: diffuse geringe vacuolisatie van levercellen, daarnaast kwetsartefacten
35	vrouw	11,2	16,3	0,315	1	1	3	135	helderrood, deels vergroot erg rode lever		
36	vrouw	9,2	8,6	0,088	4	8	26	45			
Dosis 3 - 1,0 $\mu\text{g MC-LR} / \text{gr vis WW}$ elke 12 uur											
37	man	9,0	8,8	0,16	3	5	48	215	normaal	37	Vis 37: diffuse, matige vacuolisatie, focaal enkele necrosehaardjes erythrocyten slecht kleurbaar
38	vrouw	10,5	13,9	0,186	2	4	38	86	normaal		
39	vrouw	11,0	15,8	0,24	2	4	38	58	normaal		
40	vrouw	9,7	11,9	0,176	2	4	38	34	normaal	39	Vis 39: diffuse, matige tot sterke vacuolisatie van levercellen, celnecrose van enkele levercellen, diffuus optredend
41	vrouw	10,5	13,9	0,204	1	2	19		normaal		
42	vrouw	9,9	11,2	0,216	2	4	38	32	normaal		

3.5 Methodiek

In de afgelopen jaren vonden steeds meer methodieke ontwikkelingen plaats, die zeer relevant zijn voor de studie van microcystine in het voedselweb. De veelheid aan analysetechnieken voor microcystines en andere cyanotoxines draagt in principe bij aan het verkleinen van de meetonzekerheid voor deze stoffen. Immers, wanneer met een andere detectietechniek een zelfde meetresultaat wordt bereikt dan kan aan dit resultaat een grotere betrouwbaarheid worden toegekend dan wanneer met slechts één meettechniek een analyseresultaat wordt geboekt. Het blijkt dat iedere analysetechniek zijn sterke en zwakke kanten heeft. Alleen door vergelijkend onderzoek kan worden bepaald welke techniek, onder welke omstandigheden, voor welk toxine geschikt is. Daarom werd de standaard HPLC-analyse vergeleken met microcystine analyse op de LC-MS (Liquid chromatography/mass spectrometry), waar microcystine pieken met grotere zekerheid herkend kunnen worden. Gedurende het project werd microcystine in alle voedselweb componenten (seston/fytoplankton, zoöplankton, mosselen, vissenlevers) gemeten op de HPLC na extractie van de microcystines in methanol (MeOH). Identificatie van de pieken vindt plaats op basis van een karakteristiek UV spectrum en op basis van retentietijd. Voor toepassing in de IJsselmeerstudie zijn er de volgende problemen naar boven gekomen met deze techniek:

- De standaard methode kan problematisch zijn bij dierlijk weefsel.
- De enige standaard die door AquaSense werd meegenomen bij de HPLC bepaling was microcystine-LR, een frequent voorkomende hoog toxische microcystine type. In het IJsselmeer echter werd microcystine-LR slechts in 4 monsters aangetoond met maximaal 11% van het totale microcystine gehalte. Identificatie van de overige microcystine typen die in het IJsselmeer voorkomen (en daarmee een schatting van hun toxiciteit) is niet mogelijk.
- Microcystine kan onschadelijk worden gemaakt, o.a. door binding aan glutathion (detoxicatie via de zgn. Glutathion S-transferase (GST)-route) (Pietsch *et al.* 2001). Het microcystine-glutathion conjugaat heeft nog maar 10% van de toxiciteit van het vrije microcystine. Dit conjugaat is wel op basis van retentietijd, maar niet op basis van spectrum te onderscheiden van vrij microcystine (o.a. Metcalf *et al.* 2002; Pietsch *et al.* 2001). Detoxicatie producten zijn niet speciaal geanalyseerd in de IJsselmeerstudie, alleen in een aanvullende experimentele studie in 2003.
- In een studie aan krabben-larven en zoutwater mosselen die werden blootgesteld aan microcystine is aangegeven (Williams *et al.* 1997) dat er een groot verschil kan zijn tussen standaard extractie van microcystines uit dierlijk weefsel en een extractie die *covalent gebonden microcystine* – aan eiwitfosfatasen – meeneemt. Volgens Williams *et al.* (1997) kan de extra gemeten microcystine een factor 104 hoger zijn. In de IJsselmeerstudie werd toen met deze aspecten nog geen rekening gehouden. Door uitsluitend vrije, ongebonden microcystine te meten in het voedselweb kan een grove onderschatting van de totale hoeveelheid microcystine in een organisme worden gemaakt.

De standaard HPLC-techniek zou dus enerzijds een overschatting kunnen geven van microcystine in het weefsel van dieren doordat geen onderscheid wordt gemaakt tussen microcystine en detoxicatie conjugaten die veel minder toxisch zijn. Anderzijds wordt mogelijk een (groot) deel van het microcystine niet meegenomen met de standaard MeOH extractie omdat het covalent gebonden is. De extractiemethode voor covalent gebonden microcystines kon echter alleen toxine detecteren als de organismen een hoge dosis microcystines kregen toegediend. Bovendien werden covalent gebonden microcystines alleen door Williams *et al.* (1997) beschreven.

In 2003 werd extra onderzoek met behulp van de LC-MS methode gedaan om:

- a. Uitkomsten met de HPLC en LC-MS te vergelijken.
 - b. Detoxicatieproducten te meten.
 - c. Covalent gebonden microcystines te analyseren.
- a. Met monsters van cultures van toxische *Microcystis* en met seston uit het IJsselmeer werd een directe vergelijking gemaakt tussen HPLC en LC-MS. Een vergelijking was alleen goed mogelijk voor microcystine-LR, omdat deze met zekerheid kan worden herkend op de HPLC. Hieruit bleek dat HPLC en LC-MS voor de labcultures een goede mate van vergelijkbaarheid geven (zie tabel 3.5). Opvallend is echter dat in de IJsselmeer monsters met de HPLC geen microcystine-LR werd gevonden, maar met de LC-MS wel. Dit kan betekenen dat de lage mate waarin microcystine-LR werd gevonden in het IJsselmeer seston deels een artefact is. Daarom wordt aanbevolen verder onderzoek uit te voeren met de LC-MS methode.

Tabel 3.5

Vergelijking HPLC en LC-MS voor de bepaling van microcystine-LR.

nd = microcystine-LR niet in monster aangetroffen

Monster	HPLC	LC-MS
.....
CYA140-1	4652,3	3633,7
CYA140-2	5947,0	4669,2
PCC1 (17.09)	1333,3	1292,6
PCC2 (17.09)	2120,0	2139,6
IJ1 (02-09-03)	nd	52,7
IJ2 (02-09-03)	nd	36,2
IJ3 (02-09-03)	nd	46,4
IJ1 (08-09-03)	nd	150,7
IJ2 (08-09-03)	nd	238,4
IJ3 (08-09-03)	nd	107,5

In mosselen en vis kon met behulp van de LC-MS microcystine op betrouwbare wijze (zonder mogelijke interferentie door conjugaten) worden bepaald. In levers van vissen uit het IJsselmeer werd tussen 1 en maximaal 224 ng g⁻¹ dw microcystine-LR gevonden. Het is moeilijk deze waarden met de waarden (8 - 874 µg microcystine-LR equivalenten/g dw vis!!) afkomstig van het AquaSense onderzoek te vergelijken, omdat i) de AquaSense waarden de totale hoeveelheid van alle verschillende microcystines aangeven, en ii) rekening moet worden gehouden met de natuurlijke variatie zowel in de concentratie en samenstelling van de microcystines.

- b. In het onderzoek konden detoxicatie conjugaten niet worden aangetoond in mosselen. Het is nog steeds niet duidelijk waar in proeven met *Dreissena* het toegediende microcystine blijft. Ook indien alle fracties worden doorgemeten (seston, weefsel, opgelost in water, (pseudo)-faeces) en nu ook inclusief detoxicanten (niet gevonden) en covalent gebonden microcystine blijft een groot deel van de microcystine onvindbaar.
- c. Covalent gebonden microcystine werd wel aangetoond in mosselen. De maximale hoeveelheid gebonden microcystine was 62% van de totale hoeveelheid microcystine. Dit is een veel lager aandeel van gebonden microcystine op de totale hoeveelheid microcystine dan eerder aangetoond door Williams *et al.* (1997).

4 Discussie en conclusie

4.1 Wat betekenen de resultaten voor het ecosysteem?

4.1.1 Betrouwbaarheid van de methodiek

Het project werd gestart in 1996. In de afgelopen zeven jaar zijn er veel methodische ontwikkelingen geweest die zeer relevant zijn voor de studie van microcystine in het voedselweb. De veelheid aan analysetechnieken voor microcystines en andere cyanotoxines draagt in principe bij aan het verkleinen van de meetonzekerheid voor deze stoffen. Immers, wanneer met een andere detectietechniek een zelfde meetresultaat wordt bereikt dan kan aan dit resultaat een grotere betrouwbaarheid worden toegekend dan wanneer met slechts één meettechniek een analyseresultaat wordt geboekt. Het blijkt dat iedere analysetechniek zijn sterke en zwakke kanten heeft. Alleen door vergelijkend onderzoek kan worden bepaald welke techniek, onder welke omstandigheden, voor welk toxine geschikt is.

Gedurende het project werd microcystine in alle voedselweb componenten (seston/fytoplankton, zoöplankton, mosselen, vissenlevens) gemeten op de HPLC na extractie van de microcystines in methanol (MeOH). Deze methode is nog steeds de standaard meettechniek voor microcystines in fytoplankton, maar kan problemen opleveren bij dierlijk weefsel.

Toch geven de resultaten geen aanleiding dat de HPLC-metingen aan microcystine in mosselen (en wellicht andere biota) uit het IJsselmeer overschattingen zijn geweest omdat grote hoeveelheden conjugaten werden meegenomen. Daarnaast zou het gebonden microcystine sterk minder toxisch kunnen zijn omdat het al is gebonden aan eiwitfosfatasen. De maximale hoeveelheid covalent gebonden microcystine was 62% van de totale hoeveelheid microcystine. Slechts indien microcystine dat gebonden is in weefsels van *Daphnia* vrij wordt gemaakt zou het microcystine een nieuwe binding kunnen aangaan met fosfatasen van een vis die *Daphnia* heeft gegeten. Met andere woorden slechts indien microcystine overgaat van gebonden naar de vrije vorm en opnieuw een binding kan aangaan, kan microcystine hoger in het voedselweb een toxische werking hebben. In hoeverre dit vrijmaken gebeurt is onbekend. Bovendien wordt gebonden microcystine nog sneller dan vrij microcystine uitgescheiden, hetgeen de doorgifte in het voedselweb beperkt.

Het is dus mogelijk dat de pool van vrij microcystine (MeOH extraheerbaar) een goed beeld geeft van de hoeveelheid potentieel toxische microcystine in het voedselweb.

Samenvattend is er geen reden om aan te nemen (al is extrapolatie ook hier gevaarlijk) dat de analyse van vrij microcystine zoals die in het IJsselmeer-project werd toegepast een sterk vertekend beeld heeft opgeleverd van microcystine in het voedselweb. *Voor toekomstig onderzoek wordt echter aanbevolen gebruik te maken van de LC-MS methode.*

4.1.2 Voorkomen van cyanotoxines in het IJsselmeer

Uit het van 1997 t/m 1999 uitgevoerde monitoring-onderzoek blijkt dat tijdens het fytoplankton-groei seizoen bijna altijd potentieel toxische cyanobacteriën en hun toxines (microcystines) in het IJsselmeer aanwezig zijn. Maar microcystine-LR, een van de meest toxische variant, kon slechts in 4 monsters in percentages van 2 - 11% worden aangetoond.

De microcystines komen ook in de hogere trofieniveau's terecht: 80% van de zoöplanktonmonsters, 90% van de mossel-monsters en 100% van de vislever-monsters bevatten microcystine.

Er lijkt geen bioaccumulatie of biomagnificatie op te treden: de microcystine gehalten in de hogere trofieniveau's zijn lager dan in het fytoplankton. Microcystine gehalten zijn lager in mosselen dan in zoöplankton. Daarnaast verdwijnt microcystine die is opgenomen door *Dreissena* vrij snel weer uit het weefsel. Dit betekent dat duikeenden die in de winter foerageren op mosselen niet aan microcystines worden blootgesteld. De blootstelling van hogere trofieniveau's aan microcystine is afhankelijk van het foerageergedrag: op bentisch of planktisch levende organismen.

Maar voor een goed begrip van de effecten van microcystine op het voedselweb is het niet langer voldoende naar accumulatie van microcystine te kijken. Het is de balans tussen accumulatie van microcystine via voedselopname en detoxicatie die bepaalt wat de schade van microcystine is.

4.1.3 Relevantie voor zoöplankton

Baserend op literatuuronderzoek naar de laagste *Microcystis*-dichtheden waarbij effecten op filtratiesnelheid, reproductie of overleving van Rotiferen, Copepoden en Cladoceren zijn beschreven (AquaSense 1996a) was de microcystine concentratie in het IJsselmeer bijna steeds op een voor Copepoden en Cladoceren potentieel schadelijk niveau. Zelfs bij de relatief microcystine tolerante Rotiferen zouden negatieve effecten van de aanwezige microcystines te verwachten zijn, vooral op de noordraai.

Daarom werd onderzoek gedaan naar effecten op "life history" parameters van *Daphnia*. Er blijkt een voorkeur van *Daphnia* voor relatief kleine sestondeeltjes te zijn, maar al het fytoplankton wordt met ongeveer gelijke efficiëntie verwijderd uit het water. Op die manier zou *Daphnia* microcystine kunnen opnemen indien toxische *Microcystis* aanwezig is in het voedsel. Natuurlijk seston is geen optimale voedselbron voor *Daphnia*. Het effect van microcystine (bijvoorbeeld sterfte, groeiremming) is afhankelijk van de verschillende toxiciteit van verschillende *Microcystis* stammen. De aanwezigheid van voldoende hoogwaardig voedsel kan bescherming bieden bij lage concentraties *Microcystis*. Maar de doorvertaling van de resultaten afkomstig van het lab naar het veld is moeilijk op grond van verschillende factoren, die beschermend kunnen werken:

- Aanwezigheid van alternatief voedsel en overmaat non-fytoplankton voedsel.
- Tegenstelling eencellige *Microcystis* (lab) en kolonievormend (veld), hetgeen opname van de toxische *Microcystis* in het veld zal verlagen.
- Onbekende toxiciteit van de aanwezige microcystines.
- Mogelijke aanpassing van zoöplanktonsoorten aan cyanotoxines is niet meegenomen.

4.1.4 Relevantie voor mosselen

Naast watervlooien (*Daphnia* spp.) zijn driehoeksmosselen (*Dreissena polymorpha*) belangrijke organismen in het IJsselmeer. Ten eerste zijn ze filtreerders van fytoplankton en ten tweede zijn ze voedsel voor talrijke duikeenden. Daarom werd ook in dit onderdeel van het voedselweb onderzoek gedaan naar de effecten van microcystines.

Uit de studie kwam naar voren dat adulte mosselen in tegenstelling tot larven weinig hinder lijken te ondervinden van (toxische) cyanobacteriën. Dat betekent dat de sterfte onder adulte *Dreissena*'s niet anders was dan met referentievoer, maar dat larven wel hogere sterfte toonden. De microcystine accumulatie bij *Dreissena* was niet permanent. Na een verblijf van twee weken in non-toxisch voedsel waren de mosselen weer toxinevrij. Er werd geen significant verhoogde mortaliteit bij de blootgestelde mosselen vastgesteld.

Dreissena kan verzamelde ongewenste voedseldeeltjes vóór opname in de darm verwijderen door het produceren van pseudofaeces. Daarnaast gelden ook hier de in de voorafgaande paragraaf al genoemde beschermend werkende factoren zoals onbekende toxiciteit en tegenstelling kolonievormend en eencellige *Microcystis*.

4.1.5 Relevantie voor vis

Het gelijktijdig optreden van vissterfte en cyanobacteriënbloeien was de aanleiding voor de opzet van deze studie. Men vermoedde, dat de toxines een rol bij de sterfte zouden kunnen spelen. Daarom werden microcystine gehalten gemeten in vis afkomstig uit het IJsselmeer, en in het lab microcystine aan vis toegediend om de effecten van de toxines te bestuderen. Het onderzoek leidde tot afwijkende resultaten tussen de veld- en labstudie. Zowel injecties als orale toediening van microcystine leidden tot verhoogde microcystine gehalten van de lever. Opvallend is dat in levende IJsselmeer-Baars microcystine gehalten van 2 - 12 µg microcystine/g lever voorkomen, terwijl na microcystine injectie alle vissen met lever microcystine gehalten boven 0,74 µg microcystine/g dood gingen. Dit zou erop kunnen wijzen dat in het IJsselmeer mogelijk minder toxische microcystine types voorkomen dan het hier toegepaste microcystine-LR. Maar het lijkt aannemelijk dat eerder de wijze van blootstelling een rol speelt: een acute eenmalige blootstelling zoals in het injectie-experiment, of een meer chronische blootstelling zoals in het IJsselmeer. Ook bij de orale toediening, waarbij de microcystine dosis verspreid over 4 dagen werd gegeven, trad bij de relatief hoge lever microcystine gehalten van 3 - 13,7 µg microcystine/g geen sterfte op. Degeneratie van levercellen in IJsselmeer-vis is een mogelijke aanwijzing voor het voorkomen van negatieve effecten van cyanobacteriën op vis in het IJsselmeer, maar kan ook andere oorzaken hebben dan blootstelling aan microcystine.

Bij extrapolatie van de gemeten gevoeligheid van Baars voor oraal toegediende microcystine naar veldcondities blijkt dat de in IJsselmeer-zoöplankton voorkomende microcystine gehalten met gemiddelden rond 100 µg microcystine/g AFDW de waargenomen leverschade bij Baars kunnen verklaren. Het zoöplankton microcystine gehalte waarbij vissterfte zou kunnen optreden is met de huidige gegevens helaas niet te schatten, omdat de toegepaste orale microcystine doseringen te laag waren voor lethale effecten.

Omdat er geen duidelijke verbanden tussen leverschade in vis en het microcystine gehalte van de levers kon worden vastgesteld, zou de vissterfte eerder kunnen worden verklaard door aanwezigheid van meerdere stressfactoren zoals zuurstofloosheid, hoge watertemperatuur, pH waarden en ammoniakgehalten (NH_4 wordt NH_3 wat toxisch is voor vissen), parasieten tijdens de bloei van cyanobacteriën. Maar een bijdrage van microcystine aan de sterfte kan niet worden uitgesloten.

4.1.6 Relevantie voor vogels

De gemiddelde hoeveelheid microcystine in de visleveren bedroeg 3,4 µg, de hoogste gemeten waarde werd gevonden in een Pos met 13,7 µg microcystine in de lever. Het is moeilijk de relevantie van deze gemeten microcystine gehalten voor viseters te beoordelen, onder andere omdat het gaat om niet geïdentificeerde microcystine types waarvan de toxiciteit mogelijk lager kan zijn dan van microcystine-LR. Daarnaast is de hoeveelheid microcystine in andere delen dan de lever niet bekend. Tenslotte zijn er over de gevoeligheid van visetende dieren voor microcystines geen gegevens voorhanden.

Om ondanks deze beperkingen toch een indicatie van de betekenis van de gemeten microcystine gehalten voor visetende vogels te geven, is een

schatting gemaakt van het voor Aalscholvers kritische vislever microcystine-gehalte. Daarbij is uitgegaan van de gevoeligheid van muizen voor oraal toegediende microcystine-LR (NOAEL¹ 40 µg /kg bw, Fawell & James 1994), en een gewicht en dagelijkse voedselbehoefte van Aalscholvers van respectievelijk 2,6 kg en 400 gram vis/dag (Vanhemelrijk & Peters 1993). Een berekening met deze gegevens levert de kritische waarde op van 75 µg microcystine/gr vislever AFDW. De Baarslevers en de meeste Poslevers hebben microcystine gehalten onder dit niveau. De microcystine gehalten van Spieringlevers liggen hier echter merendeels boven, tot maximaal een factor 12. Baserend op de gemeten concentraties in Spiering, op resultaten uit het laboratoriumonderzoek en berekeningen in de literatuur is sterfte van visetende vogels niet waarschijnlijk, maar wel het optreden van leverschade.

Microcystine die is opgenomen door bijvoorbeeld *Dreissena* verdwijnt vrij snel weer uit het weefsel. Dit betekent dat duikeenden die in de winter foerageren op mosselen niet aan microcystines worden blootgesteld.

4.2 Hoe erg zijn de effecten uiteindelijk?

Bij de waargenomen microcystine niveaus zijn negatieve effecten te verwachten van het fytoplankton-microcystine op zoöplankton, van het zoöplankton-microcystine op vis, vooral op juveniele vis, en van vis- microcystine, met name in Spieringlevers, op visetende vogels zoals Aalscholvers. In werkelijkheid vallen deze effecten echter mee want:

- Ze zijn gebaseerd op literatuurgegevens van het veel voorkomende en sterk toxische microcystine-LR, terwijl in het IJsselmeer meestal andere, niet nader geïdentificeerde microcystine types voorkomen, die minder toxisch blijken te zijn.
- Daarnaast is een deel van de microcystine covalent gebonden. Het is echter mogelijk, dat dit gedeelte microcystine gebonden aan proteïne-fosfatasen van bijvoorbeeld *Daphnia* niet erg toxisch is voor zoöplankton-etende vis. Want eerst moet het toxine loskomen van de fosfatase voordat het kan binden aan vis-fosfatase.
- Er zitten veel non-fytoplankton deeltjes in het IJsselmeer- en Markermeer-seston waardoor ook bij hoge cyanobacterie-dichtheden de fractie cyanobacteriën in het dieet laag blijft. De overmaat aan non-fytoplankton deeltjes kan voor niet-selectieve grazers in feite een bescherming vormen tegen toxische cyanobacteriën.
- Er zijn in dit onderzoek geen negatieve effecten van microcystine op de levensgemeenschap van het IJsselmeer aangetoond. De reproductie van *Daphnia* was niet gecorreleerd met het microcystine gehalte van het voedsel, adulte *Dreissena*'s ondervonden weinig hinder en leverschade in vislevers was niet gecorreleerd met het microcystine gehalte van de levers.

.....
Noot

¹ No observed adverse effect level. Effecten op histopathologie en serum enzymen zijn beoordeeld.

Voor de toekomst worden de volgende aanbevelingen gegeven:

Hoewel een direct verband tussen microcystine gehaltes en schadelijke effecten in verschillende organismen niet kon worden aangetoond, betekent dit niet, dat microcystines geen rol in het voedselweb van het IJsselmeer spelen. Voor een beter inzicht in de ecologische effecten van de waargenomen toxineniveaus is aanvullend onderzoek naar identiteit en toxiciteit van de in het IJsselmeer voorkomende microcystines essentieel. Voor dit onderzoek zou gebruik moeten worden gemaakt van de LC-MS methode.

4.2.1 Betekenis voor vogelsterfte (Volkerak-Zoommeer en Oostvaardersplassen)

In 2002 en 2003 traden in het Volkerak-Zoommeer en de Oostvaardersplassen massale vogelsterftes op (circa 5.000 dode eenden en andere vogelsoorten in het VZM en 10.000 dode eenden in Oostvaardersplassen). In het verleden ging men meestal uit van botulisme als doodsoorzaak. Maar in deze gevallen werd de vogelsterfte in verband gebracht met het gelijktijdig optreden van massale blauwalgenbloei en drijfslagen. Baserend op de gemeten concentraties in spiering, op resultaten uit het laboratoriumonderzoek en berekeningen in de literatuur (zie paragraaf 4.1.6) is sterfte van visetende vogels niet waarschijnlijk, maar wel het optreden van lever schade.

Voor de vogels in de Oostvaardersplassen toonden verlamingsverschijnselen, wat een gevolg van een vergiftiging door een ander cyanotoxine – het neurotoxine "anatoxine" – kan zijn, een gif dat bijvoorbeeld door de cyanobacteriën *Aphanizomenon* en *Anabaena flos-aquae* wordt geproduceerd. De aanwezigheid van een sublethale dosis microcystine versterkt de toxiciteit van anatoxine (Chorus *et al.* in Chorus 2001). Helaas zijn er geen data beschikbaar van anatoxine uit de Oostvaardersplassen, maar gezien de aanwezigheid van microcystine in de monsters en *Anabaena flos-aquae*, die bekend staat voor de productie van anatoxine-a, zouden cyanotoxines een bijdrage kunnen hebben geleverd aan de dood van de vogels. Daarnaast werd in "het Bovenwater", een plas dichtbij de Oostvaardersplassen (niet in verbinding), in augustus naast de aanwezigheid van *Anabaena flos-aquae* ook 1,4 µg anatoxine-a /g drooggewicht seston, 4,4 µg/g MC-LR en 6,8 µg/g MC-LA aangetoond.

Er kan momenteel echter geen duidelijke uitspraak over de oorzaak van de vogelsterfte worden gedaan, omdat een direct verband tussen microcystine gehaltes en mogelijk schadelijke effecten bij diverse organismen ontbreekt. Maar al met al is er een sterke aanwijzing dat cyanotoxines een bijdrage hebben geleverd aan de sterfte van de vogels.

De ontwikkeling van een betrouwbare analysemethode is een belangrijke taak voor de toekomst, om een verklaring voor de massale vogelsterfte te vinden.

5 Literatuur

- AquaSense 1996a. Begrazing van IJsselmeer- en Markermeer-seston door *Daphnia galeata*. In opdracht van RIZA Lelystad. Rapportnr. 0814.
- AquaSense 1996b. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines. Een literatuurstudie. In opdracht van Rijkswaterstaat. Rapportnr. 0786.
- AquaSense 1997. Groei en reproductie van *Daphnia* in IJsselmeer en Markermeer. Resultaten life-history experimenten 1996. In opdracht van: RIZA Lelystad. Rapportnr. 97.0942.
- AquaSense 1998. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines. Onderzoek '97. In opdracht van RIZA en RDIJ. Rapport 98.1030-3.
- AquaSense 2000. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines. Onderzoek '99. In opdracht van RIZA en RDIJ. Rapportnr. 1030-5.
- AquaSense 2002a. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer. I. monitoring 1997 t/m 1999. In opdracht van: RIZA. Rapportnummer 1030-7a.
- AquaSense 2002b. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer. II. Experimenten 1996 t/m 2000. In opdracht van: In opdracht van: RIZA. Rapportnummer 1030-7b.
- Best J.H., Pflugmacher S., Wiegand C., Eddy F.B., Metcalf J.S., Codd G.A. 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). AQUATIC TOXICOLOGY 60 (3-4): 223-231.
- Chorus, I. & Bartram, J. (eds.) 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. E&FN Spon, London.
- Chorus, I. 2001. Cyanotoxins. Occurrence, causes, consequences. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Dionisio Pires, M., Kusserow, R. & Van Donk, E. 2003. Influence of toxic and non-toxic phytoplankton on feeding and survival of *Dreissena polymorpha* (Pallas) larvae. Hydrobiologica 491: 193-200.
- Falconer I.R., 1991. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environ. Toxicol. Water Qual. 6 (2): 177-184.
- Fawell J.K. & James H.A. 1994. Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Water Research Centre, Medmenham, UK, 1-46.
- Hartgens E. & Dekker 2000. Vissen. In: Biologisch monitoring zoete rijkswateren. IJsselmeer en Markermeer. RIZA rapportage 2000.050.
- Ibelings B., Dionisio Pires M. & Brehm M. 2003. Cyanotox: Experimenteel onderzoek naar de toxische effecten van microcystines op water-vlooien en driehoeksmosselen. Rapportage in opdracht van RIZA.
- Kotak B.G., Kenefick S.L., Fritz D.L., Rousseaux C.G., Prepas E.E. and Hruday S.E. 1993. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. Wat. Res. 27: 495-506.
- Lammens, E. 1999. Het voedselweb van het IJsselmeer en Markermeer. RIZA rapport 99.008, Lelystad.

-
- Metcalf J.S., Beattie K.A., Ressler J., Gerbersdorf S., Pflugmacher S., Codd GA 2002. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *water supply, res. & technol.-AQUA* 51 (3): 145-151.
- Nijssen, H. & S.J. de Groot 1987. *De vissen van Nederland*. Uitg. KNNV, Utrecht.
- Pietsch C., Wiegand C., Ame M.V., Nicklisch A., Wunderlin D., Pflugmacher S. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: Evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environmental toxicology* 16 (6): 535-542.
- STOWA 2000. *Toxische blauwalgen in recreatiewateren*. Rapport Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer en Interprovinciaal Overleg.
- Tencalla F.G., Dietrich D.R., Schlatter C. 1994. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 30: 215-224.
- Tsuji K., Masui H., Uemura H., Mori Y., Harada K. 2001. Analysis of microcystins in sediments using MMPB method. *Toxicon* 39 (5): 687-692.
- Vanhemelrijk J.A.M. and Peters J.S. (eds.) 1993. *Amoebes IJsselmeergebied*. Studie naar ecologische ontwikkelingsrichtingen voor het IJsselmeergebied. RIZA nota 93.014.
- Williams D.E., Craig M., Dawe S.C., Kent M.L., Holmes C.F.B., Andersen R.J. 1997: Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chem. Research in toxicology* 10 (11): 1293-1293.