



Herman Gons, NIOO-KNAW Centrum voor Limnologie

Ingmar Janse, NIOO-KNAW Centrum voor Limnologie, thans RIVM

Edwin Kardinaal, Universiteit van Amsterdam, thans DHV

Michelle Talsma, STOWA

Detectie van toxische cyanobacteriën met DNA-technieken in Nederlandse wateren

Het voorkomen van cyanotoxines in zwemwater dient vroegtijdig te worden gesignaleerd. Aangezien toxinevorming per soort en ondersoort van cyanobacteriën sterk uiteen kan lopen, schiet microscopisch onderzoek hierbij tekort. Met behulp van moleculair biologische (DNA-)technieken bleken toxische en niet-toxische cyanobacteriestammen goed van elkaar te onderscheiden. In het DYNATOX-project zijn methoden uitgewerkt om cyanobacteriën in oppervlaktewater tot op stamniveau te detecteren. De detectie bleek zeer gevoelig. Toxische *Microcystis*-soorten werden al aangetoond voorafgaand aan de aanwezigheid van meetbare hoeveelheden toxines. Er zijn methoden in ontwikkeling om celaantallen van de belangrijkste toxische geslachten uit DNA-monsters te bepalen. Met deze gegevens kan de waterbeheerder het eventuele ontstaan van een gezondheidsrisico tijdig inschatten.

Een belangrijk gevolg van eutrofiëring van oppervlaktewater is het optreden van overmatige groei van cyanobacteriën. De blauwalgen geven het water een onaantrekkelijk aanzien en kunnen bovendien zeer giftig zijn. Dodelijke giftigheid voor zoogdieren is al in de 19e eeuw beschreven¹⁾, maar sterfte onder mensen als gevolg van het in aanraking komen met deze stoffen bleef onbevestigd tot 1996. In dat jaar werd de wereld opgeschrikt door de dood van tientallen mensen na het ondergaan van hemodialyse in een Braziliaans ziekenhuis. Onderzoek wees op vergiftiging met microcystines door het gebruik van water uit een reservoir met sterke cyanobacteriegroei. Microcystines zijn een belangrijke groep van cyanotoxines, toxische stoffen die worden gevormd in de cellen van cyanobacteriën²⁾. In Nederlandse inventarisaties werd geconstateerd dat in vrijwel alle meren met sterke cyanobacteriegroei microcystines voorkwamen, meerdere malen ruim boven de door de Commissie Integraal Waterbeheer geadviseerde zwemwaternorm van 20 µg/l^(3),4),5),6),7).

De hoogste concentraties kwamen voor in drijfslagen van cyanobacteriën. In een aantal drijfslagen werden echter vrijwel geen microcystines gedetecteerd. Het is duidelijk dat bepaalde (onder)soorten vanaf bepaalde populatiedichtheden een groot risico met zich meebrengen voor de gezondheid van mens en dier, terwijl andere cyanobacteriën onder vergelijkbare omstandigheden geen toxines produceren.

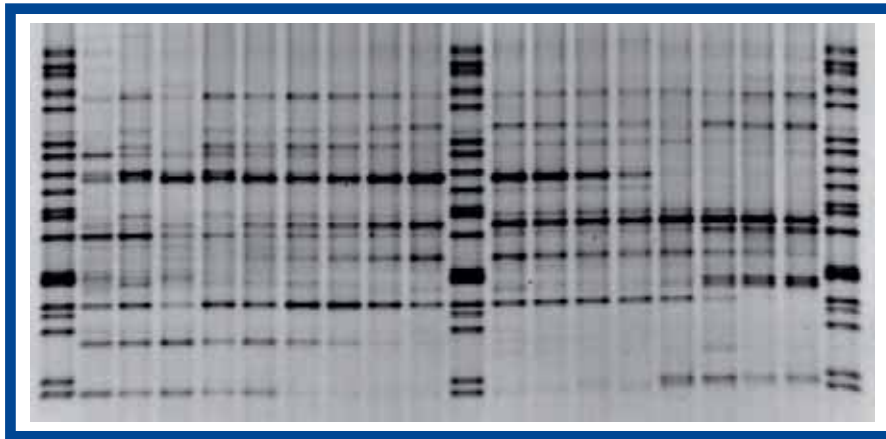
De vraag is nu hoe dit gezondheidsrisico tijdig in te schatten. Een rechtstreekse benadering is analyse van gehalten aan microcystines en andere cyanotoxines. Hierop baseerde de CIW een besluisboom om bij mogelijke cyanotoxine-problemen in recreatiewater over te gaan tot een waarschuwing of zwemverbod⁷⁾. Na extractie uit het celmateriaal volgt bepaling van microcystines door middel van HPLC (High Performance Liquid Chromatography) of ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). In de vorm van een eenvoudig te gebruiken, zeer gevoelige ELISA-immunokit leveren antilichamen snel resultaten op, maar

worden niet alle microcystines gedetecteerd. De HPLC-methode kan dat laatste wel, maar is bewerkelijk. Een belangrijk probleem bij de monsternamen is ongelijkmatige verspreiding van cyanobacteriesoorten, vooral door vorming van drijfslagen op onverwachte momenten en plaatsen binnen een meer. Hierdoor ontstaan lokaal honderden malen hogere toxineconcentraties dan in goed gemengd water. Er bestaat behoefte aan kennis over de populaties van toxische cyanobacteriën die in een meer aanwezig zijn en de omstandigheden waaronder deze leiden tot normoverschrijdende concentraties van toxines.

Als voornaamste risicofactor gelden in Nederland de drijfslagvormende *Microcystis*-soorten. Kenmerkend zijn de min of meer bolvormige kolonies van dikwijls duizenden cellen die met het blote oog te zien zijn. Ook vertegenwoordigers van de geslachten *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Planktothrix*, waarvan de cellen in draden zijn gerangschikt, produceren microcystines en andere gevaarlijke toxines⁶⁾. *Aphanizomenon*

flos-aquae vormt bundels van draden die ook in drijfslagen voorkomen, dikwijls naast *Microcystis*. In principe zou het microscopisch vaststellen van de populatiedichtheden van cyanobacteriën een indicatie van het toxinerisico geven. Het is echter tijdrovend en specialistisch werk om (onder)soorten van de vier genoemde geslachten naar verschijningsvorm te onderscheiden. Van *Microcystis* in kolonievorm wordt een tiental soorten herkend, maar losse cellen zijn niet te benoemen. Ook microscopisch sterk gelijkende draadvormige cyanobacteriën betreffen soms heel verschil-

lende soorten⁸⁾. Belangrijk bezwaar van de gebruikelijke microscopische tellingen is dat naar verschijning identieke stammen zowel toxisch als niet-toxisch kunnen zijn, zoals met name voor *Microcystis* bekend is⁹⁾. Sinds enkele jaren zijn echter moleculair biologische technieken beschikbaar die het mogelijk maken in schijnbaar identieke cyanobacteriën verschillende stammen te herkennen. Wanneer bekend is welke stammen toxines produceren, is detectie van deze stammen de eerste waarschuwing voor een gezondheidsrisico later in het seizoen.



Afb. 1. DGGE-profielen van de cyanobacteriëngemeenschap in de Loosdrechtse Plassen op 17 monsterdagen. De gel vertoont het migratiepatroon van DNA-fragmenten in verticale banen. De positie van elk bandje kan direct worden vergeleken met die voor bekende basenvolgorde van cyanobacteriën in de banen v.l.n.r. 1, 11 en 20. Zo is het aannemelijk dat bijvoorbeeld het onderste bandje uit de watermonsters afkomstig is van *Planktothrix* sp. Zekerheid hieromtrent wordt verkregen door bepaling van de basenvolgorde na uitsnijden van een bandje.

Bepaling diversiteit en identiteit micro-organismen

■ DNA-isolatie

Cellen van in het veld aanwezige of in het laboratorium gekweekte organismen worden geconcentreerd, waarna het DNA wordt geëxtraheerd en gezuiverd. De DNA-moleculen zijn dubbelstrengig, waarvan beide strengen bestaan uit reeksen van vier verschillende nucleotiden, de basen adenine (A), cytosine (C), guanine (G) en thymidine (T). Zulk dubbelstrengig DNA ontstaat door bindingen van tegenover elkaar liggende basen, waarbij A bindt met T en C met G. Door deze paarsgewijze binding zijn de twee strengen of fragmenten daarvan als het ware elkaars afdruk en worden complementair genoemd;

■ amplificatie

Het DNA wordt gedeneureerd ('gesmolten'), dat wil zeggen dat dubbelstrengig DNA door temperatuurverhoging uiteenvalt tot enkelvoudige strengen. In aanwezigheid van enzymen wordt DNA vervolgens in een aantal cycli van opwarming en afkoeling geamplificeerd (vermenigvuldigd) door middel van de PCR-methode (Polymerase Chain Reaction). Fundamenteel hierbij is de beschikbaarheid van specifieke korte reeksen van basen ('primers'), die het te amplificeren DNA-fragment (meestal enige honderden basenparen lang) begrenzen. Cyanobacteriën kunnen worden geselecteerd door toepassing van een cyanobacteriespecifieke 16S-rRNA 'primer' voor de PCR¹⁰⁾;

■ scheiding van DNA-fragmenten

Het PCR-product bestaat uit een mengsel van dubbelstrengig DNA-fragmenten, die verschillen in basenvolgorde. Een veelvuldig toegepaste techniek voor het scheiden van de verschillende fragmenten is DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), die berust op het denatureren van het DNA door bepaalde chemicaliën. Het DNA wordt opgebracht in een gel met een gradiënt van deze chemicaliën, waarna de verschillende fragmenten op unieke posities in de gel belanden. Aldus ontstaan profielen waarbij qua basensamenstelling identieke fragmenten zich ophopen in een bandje in de gel (afbeelding 1). De bandjes in een gel vertegenwoordigen elk een bepaald genotype;

■ identificatie

De bandjes in de gel worden uitgesneden, waarna dit DNA opnieuw wordt geamplificeerd en gebruikt voor het ophelderen van de basenvolgorde (sequentie). Onderlinge verwantschap is af te leiden uit een door clusteranalyse verkregen 'stamboom' van sequenties. Identificatie vindt plaats door vergelijking met de sequenties van bekende isolaten van micro-organismen.

Moleculair-biologisch

Ontwikkeling en toetsing van een gevoelige techniek voor vroegtijdige signalering van toxische cyanobacteriën werd nagestreefd in het door STW met bijdragen van STOWA gefinancierde project 'Dynamics, toxin induction and early detection of toxic cyanobacteria in Dutch lakes' (DYNATOX, 2000-2005). Binnen deze samenwerking van NIOO-KNAW en de Universiteit van Amsterdam is het meeste werk verricht aan het genetisch identificeren van toxische en niet-toxische vertegenwoordigers van *Microcystis*. Hierbij werd de aandacht gericht op het DNA in de ribosomale RNA (rRNA)-genen, die voorkomen in alle bacteriën, dus ook cyanobacteriën. Hoewel de ribosomen in alle organismen een vergelijkbare functie (eiwitsynthese) en structuur hebben, is in de loop van de evolutie een aanzienlijke variatie in deze genen ontstaan. De mate van verwantschap is af te lezen uit verschil in de DNA-basenvolgorde. Segmenten van de rRNA-genen vertonen een verschillende mate van variatie en afhankelijk van het beschouwde segment zijn micro-organismen te identificeren tot op een gewenst niveau: familie, genus, soort of stam. De diversiteit aan organismen in een bodem- of watermonster kan opgehelderd worden aan de hand van de aanwezige diversiteit in deze stukjes DNA. De dikwijls subtiele verschillen in basenvolgorde worden zichtbaar als een bandenpatroon op een elektroforese-gel (zie eerste kader en afbeelding 1).

In de microbiologie is veel onderzoek gedaan aan het 16S-rRNA-gen als taxonomisch kenmerk. Dit gen is geschikt voor het onderscheiden van bacteriën tot op genusniveau, maar de resolutie is onvoldoende voor identificatie van soorten en stammen. Uit het DYNATOX-onderzoek bleek dat DNA in het rRNA ITS-gebied (Internal Transcribed Spacer tussen de 16S-rRNA en 23S-rRNA genen) wel bruikbaar is voor het identificeren van isolaten van *Microcystis*^{10,11)}. Op deze manier werden na scheiding met DGGE (zie kader) 107 geïsoleerde kolonies uit 15 meren in negen Europese landen en Marokko¹¹⁾ gegroepeerd.

Deze kolonies werden ook op aanwezigheid van microcystines onderzocht. Er waren twee zeer belangwekkende bevindingen. In de eerste plaats bleken de microcystineproducerende isolaten herkenbaar aan de hand van de rRNA ITS-samenstelling. Op een enkele uitzondering na waren steeds alle isolaten binnen een bepaalde nauwverwante groep (cluster) al dan niet toxisch. In de tweede plaats bleken identieke rRNA ITS-samenstellingen voor te komen in geografisch ver van elkaar verwijderde meren. Op grond van de clusters zijn stamspecifieke 'probes', kleine stukjes DNA (zie tweede kader), ontwikkeld. Naar verwachting zijn de probes geschikt voor detectie van toxische *Microcystis* en bovendien toepasbaar in een zeer brede regio¹²⁾. Met de Reverse Line Blot-methode, waarbij de probes op een dragermembraan ('blot') zijn aangebracht, kan de detectie van *Microcystis* (onder)soorten efficiënt plaatsvinden (zie tweede kader en afbeelding 2).

Toepassing in Nederlandse wateren

De mogelijke toepassing van de hierboven beschreven methoden in het waterbeheer werd getest in een samenwerking met waterbeheerders en dienstverlenende laboratoria¹²⁾. Op het Centrum voor Limnologie (NIOO-CL) werd de RLB-methode geoptimaliseerd voor de praktijk, met speciale aandacht voor de implementatie buiten het NIOO-CL. Door de deelnemende instanties werden van juni tot en met augustus 2005 in twaalf meren tweeweekelijks monsters genomen, waarbij drijfslagen werden gemeden. Voor zowel RLB als bepaling van microcystines werden de monsters bewerkt op Het Waterlaboratorium te Haarlem. Na het oplossen van aanloopproblemen slaagde dit laboratorium er in om hybridisatiepatronen te produceren die vergelijkbaar waren met die van het NIOO-CL voor dezelfde monsters.

Het volgen van meren in de tijd met de probes van Janse c.s. geeft antwoord op drie vragen, namelijk of *Microcystis* aanwezig is, de aanwezige *Microcystis*-stammen tot bekende toxische of niet-toxische groepen behoren én of het voorkomen van deze groepen in de loop van het seizoen verandert. Met de RLB-methode werd *Microcystis* aangetoond in 63 van het totaal van 72 onderzochte watermonsters. Meestal bestond een tamelijk gelijkmatige verspreiding over toxische en niet-toxische groepen. Slechts in enkele gevallen waren nagenoeg alleen toxische of niet-toxische groepen aanwezig. Dit beeld veranderde niet na analyse van 24 extra meren die slechts eenmaal werden bemonsterd. De seizoensdynamiek verschilde sterk van meer tot meer. In het Volkerak-Zoommeer bijvoorbeeld bleek de groepsamenstelling heel stabiel, terwijl met name in kleine wateren veel variatie in de tijd werd gevonden.

Van de bovengenoemde 72 watermonsters werden ook de gehalten aan microcystines gemeten met de ELISA-methode. Een eenvoudig verband met de resultaten van de RLB-methode is hierbij niet te verwachten, onder meer omdat vorming van microcystines ook plaatsvindt binnen andere geslachten van cyanobacteriën, die niet met de *Microcystis*-probes worden gedetecteerd. Een belangrijk resultaat was dat in bijna de helft van de monsters de concentraties dichtbij of onder de detectiegrens lagen, terwijl met de RLB-methode wel degelijk de aanwezigheid van toxische *Microcystis*-stammen werd aangetoond. Overigens zijn al probes ontwikkeld om naast *Microcystis* vertegenwoordigers van *Anabaena/Aphanizomenon* en *Planktothrix* te detecteren. Ook de werking van deze probes werd in de zomer van 2005 nagegaan en was volgens verwachting. De gebruikte RLB-techniek kan slechts aan- of afwezigheid van de onderzochte organismen detecteren. Met een moderne variant van de PCR-methode (QPCR) kunnen ook populatiedichtheden worden bepaald. Om groepen van cyanobacteriën te kwantificeren, bleek de hiertoe geteste QPCR-methode in de zomer van 2005 echter nog niet toereikend. De ingeslagen weg dient te worden vervolgd,

Gebruik genotypische probes in Reverse Line Blot-hybridisatie

■ isolatie en amplificatie

Voorafgaand aan de Reverse Line Blot (RLB) wordt DNA uit een watermonster geïsoleerd en geamplificeerd met primers die specifiek zijn voor het rRNA ITS-gebied. Aan één van de primers is biotine gebonden, zodat de geamplificeerde DNA-fragmenten in de RLB zichtbaar te maken zijn (zie ook het laatste punt);

■ 'probes'

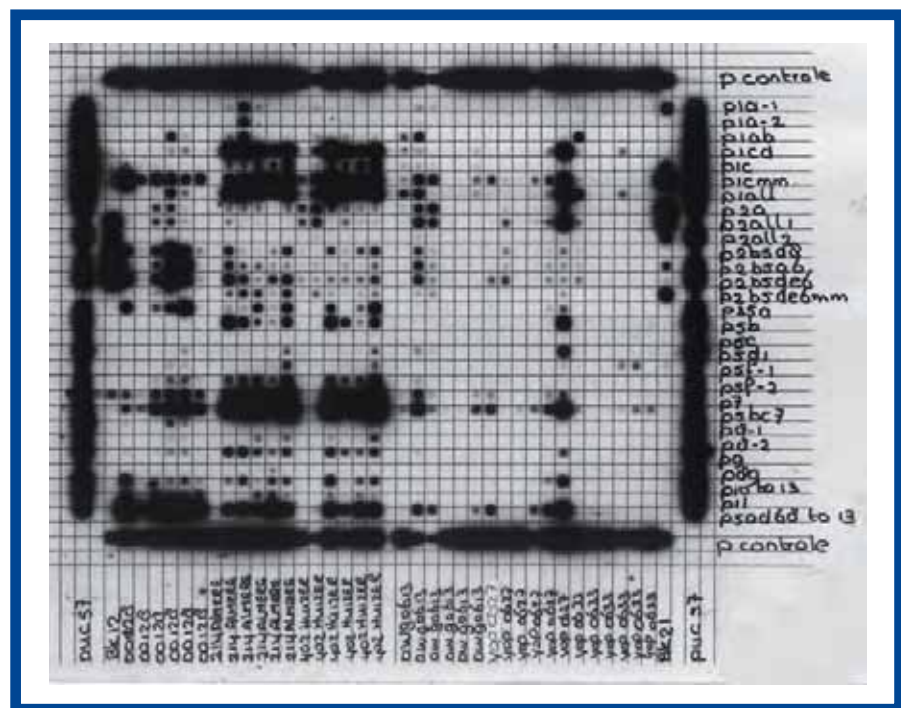
rRNA ITS-sequenties zijn afgeleid die specifiek zijn voor nauwverwante groepen onder circa 150 onderzochte isolaten van *Microcystis*. Onder de juiste omstandigheden hechten deze sequenties zich aan complementaire sequenties van enkelstrengs DNA (probes). Dit hechtingsproces wordt hybridisatie genoemd. In totaal werden 29 probes ontwikkeld;

■ hybridisatie

Met de RLB-methode kan hybridisatie van DNA-fragmenten met de 29 probes - dus het voorkomen van de hiermee corresponderende taxa van *Microcystis* - uit tientallen watermonsters tegelijkertijd worden nagegaan. De probes worden in parallelle rijen op een membraan gebonden. Het geamplificeerde DNA uit de verschillende watermonsters wordt kruiselings met de probes in contact gebracht. Complementaire DNA-fragmenten en probes hechten zich aan elkaar, terwijl niet-complementaire fragmenten worden verwijderd door een wasprocedure;

■ detectie

Na het wassen wordt een enzym toegevoegd dat zich bindt aan het biotinelabel van de gehechte DNA-fragmenten. Tenslotte wordt een substraat voor dit enzym toegevoegd, waardoor de kruispunten op het membraan waar hybridisatie heeft plaatsgevonden, chemoluminescentie vertonen (zie afbeelding 2).



inzicht in een mogelijk gezondheidsrisico;

- Verfijning van de QPCR-methode voor bepaling van de cel aantallen van de voornaamste groepen van potentieel toxische cyanobacteriën is gewenst voor vroegtijdige inschatting van gezondheidsrisico door cyanotoxines.

Literatuur

- 1) Francis G. (1878). Poisonous Australian lake. Nature deel 18, pag. 11-12.
- 2) Codd G., J. Lindsay, F. Young, L. Morrison en J. Metcalf (2005). Harmful cyanobacteria. From mass mortalities to management measures. In J. Huisman, H. Matthijs en P. Visser (redactie) Harmful cyanobacteria, pag. 1-23. Springer, Dordrecht.
- 3) STOWA (2000). Toxische blauwalgen in recreatiewateren. Rapport 2002-20.
- 4) Krot B. en P. Visser (2003). Inventarisatie naar de concentraties van cyanotoxines in Nederlandse meren gedurende zomer 2003 en naar eventuele hiermee samenhangende incidenten, een Quick Scan. Rapport Aquatische Microbiologie IBED/UvA.
- 5) Kardinaal W. en P. Visser (2005). Cyanotoxines drijven tot overlast: Inventarisatie van microcystineconcentraties 2000-2004 in Nederlandse oppervlaktewateren. RIZA-werkdocument 2005.57x.
- 6) Janse I., W. Kardinaal, M. Meima, M. Agterveld-Kamst, P. Visser en G. Zwart (2005). Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two Planktothrix dominated freshwater lakes. Environ. Microbiol. deel 7, pag. 1514-1524.
- 7) CIW (2002). Veilig zwemmen: Cyanobacteriën in zwemwater. Aangepast protocol 2002. Rapport Commissie Integraal Waterbeheer.
- 8) Zwart G., M. Kamst-van Agterveld, I. van der Werff-Staverman, F. Hagen, H. Hoogveld en H. Gons (2005). Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. Environ. Microbiol. deel 7, pag. 365-377.
- 9) Kardinaal W. en P. Visser (2005). Dynamics of cyanobacterial toxins. Sources of variability in microcystin concentrations. In J. Huisman, H. Matthijs en P. Visser (redactie) Harmful cyanobacteria, pag. 41-63. Springer, Dordrecht.
- 10) Janse I., M. Meima, W. Kardinaal en G. Zwart (2003). High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. deel 69, pag. 6634-6643.
- 11) Janse I., M. Meima, W. Kardinaal, J. Fastner, P. Visser en G. Zwart (2004). Toxic and nontoxic Microcystis colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. Appl. Environ. Microbiol. deel 70, pag. 3979-3987.
- 12) Kardinaal W., R. Bissesar en G. Zwart (2006). DNA-technieken voor detectie van cyanobacteriën: praktijktesten CYANOKIT en Q-MAAP in Nederlandse oppervlaktewateren. Rapport NIOO-KNAW Centrum voor Limnologie, Nieuwersluis.