

stowa

STANDAARDISERING EN VALIDATIE VAN METHODEN VOOR
DE NEDERLANDSE WATERKWALITEITSBEHEERDERS

CYANOTOXINE MONITORING



RAPPORT

2009
21

CYANOTOXINE MONITORING: STANDAARDISERING EN VALIDATIE
VAN METHODEN VOOR DE NEDERLANDSE WATERKWALITEITSBEHEERders

STOWA

2009

21

ISBN 978.90.5773.438.0



Publicaties van de STOWA kunt u bestellen op www.stowa.nl

COLOFON

COLOFON

Utrecht, juni 2009

UITGAVE STOWA, Utrecht

AUTEUR Ron van der Oost Waternet

DIT PROJECT IS BEGELEID DOOR DE WERKGROEP CYANOBACTERIËN

Hans Ruiten	Waterdienst, voorzitter
Petra Visser	Universiteit van Amsterdam
Detmer de Waal	Universiteit van Amsterdam
Jasper Stroom	Waternet
Marieke Euwe	Wetterskip Fryslân
Guido Waajen	Waterschap Brabantse Delta
Henk Tamerus	Waterschap De Dommel
Ana Maria de Roda Husman	RIVM-MGB
Ciska Schets	RIVM-MGB
Cees Collé	Provincie Gelderland
Mike Lurling	Wageningen Universiteit
Miguel Dionisio	Deltares
Michelle Talsma	STOWA
Ron van der Oost	Waternet

UITVOERDER

Ron van der Oost Waternet

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau

STOWA rapportnummer 2009-21
ISBN 978.90.5773.438.0

TEN GELEIDE

Cyanobacteriën kunnen giftige toxines produceren, waarvan microcystine voor de Nederlandse wateren de belangrijkste is. Hoge gehalten aan de toxines kunnen in oppervlaktewater problemen veroorzaken voor mens en milieu. De Europese Zwemwaterrichtlijn schrijft daarom voor dat gezondheidsrisico's ten gevolge van cyanobacteriën voorkomen moeten worden.

Om inzicht te krijgen in de mogelijke risico's van microcystines in zwemwateren is een eenduidige monsternamen- en analysemethodiek noodzakelijk. Op verzoek van de werkgroep Cyanobacteriën heeft STOWA aan Waternet opdracht verleend voor de ontwikkeling van een eenduidige monitorings- en analyse procedure.

In dit rapport treft u de resultaten van het onderzoek om te komen tot een optimale on-dubbelzinnige methode voor cyanotoxine monitoring (monsterneming, extractie en analyse) aan. Het onderzoek heeft geresulteerd in een bemonsteringsprotocol en een analyseprotocol voor microcystine onderzoek. De protocollen worden als betrouwbaar beschouwd voor oppervlaktewateren met *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie.

Wij raden u de ontwikkelde protocollen ten eerste aan als u onderzoek gaat doen naar de aanwezigheid van microcystines in het oppervlaktewater.

De directeur van de STOWA

Ir. J.M.J. Leenen

SAMENVATTING

Omdat cyanobacteriën giftige cyanotoxines (bijvoorbeeld microcystine) kunnen produceren, kan een verhoogd gehalte in oppervlaktewater problemen veroorzaken voor mens en milieu. In het protocol van de Commissie Integraal Waterbeheer (CIW), dat door de meeste Nederlandse Waterkwaliteitsbeheerders wordt gehanteerd, is een raamwerk beschreven voor de monitoring van cyanotoxines. Het is echter niet duidelijk wat de beste manier is om, binnen de grenzen van dit raamwerk, de risico's voor de zwemmers te bepalen. Daarom heeft Waternet (Waterproef laboratorium, Edam) in opdracht van STOWA een door de werkgroep Cyanobacteriën voorgesteld onderzoek uitgevoerd om te komen tot een optimale monitoring procedure. Het doel van dit project is om ondubbelzinnige methoden te beschrijven voor cyanotoxine monitoring (monsterneming, extractie en analyse), waarmee zowel de veiligheid van de zwemmers als de economische belangen worden beschermd. De adviezen die naar aanleiding van een uniforme cyanotoxine monitoring worden gegeven (waarschuwing en/of zwemverbod) worden hiermee meer betrouwbaar.

De werkgroep Cyanobacteriën heeft nieuwe richtlijnen voor de bemonstering van oppervlaktewater met cyanobacteriën opgesteld. In dit protocol worden vier situaties onderscheiden die visueel kunnen worden waargenomen: drijfslag binnen de zwemzone, drijfslag buiten de zwemzone, cyanodominantie of verdachte locatie zonder visuele indicatie. Voor elke situatie wordt de strategie (waar en hoeveel monsters nemen?) en de uitvoering (hoe bemonsteren?) beschreven. Het protocol is in 2005 verstuurd naar mensen van waterschappen en provincies die betrokken zijn bij de kwaliteitsbeoordeling van zwemwater. In 2006 zijn de ervaringen met het protocol geëvalueerd aan de hand van de commentaren op een vragenlijst en is een herzien protocol opgesteld (bijlage 1). In de definitieve versie van het protocol is ook een interpretatie van de analysegegevens opgenomen.

In 2005 is een onderzoek uitgevoerd naar de betrouwbaarheid van verschillende snelle en simpele extractiemethoden: trillen met ultrasoon probe, koken in waterbad, verwarming met magnetron en herhaald invriezen en ontdooien. De methoden werden alle vergeleken met de betrouwbare maar tijdrovende methanol extractie volgens Fastner et al. (1998). Het onderzoek werd uitgevoerd in vier monsters met verschillende hoeveelheden en soorten cyanobacteriën. Op grond van het rendement en de reproduceerbaarheid van de extracties werd geconcludeerd dat een van de simpelste methoden, 30 minuten koken in een waterbad, gemiddeld de beste resultaten gaf. Een verlenging van de kooktijd (40 en 60 minuten) bleek geen duidelijke invloed op de kwaliteit van deze extractie te hebben. Toevoeging van methanol aan het ruwe monster (volumeverhouding 1:1) bleek een positieve invloed te hebben op zowel het rendement als de reproduceerbaarheid van de extractie. In 2006 is onderzocht of het protocol voor de extractie verder kon worden versimpeld en is de noodzaak van centrifugeren en filtreren nagegaan. Het bleek niet nodig om deze stappen uit te voeren mits er een intensieve homogenisatie van het extract plaatsvindt voordat het extract wordt geanalyseerd. Vervolgens werd getoetst of een vergelijkbare extractiemethode waarbij de cellen werden geconcentreerd op een filter ook geschikt is voor een HPLC analyse van microcystine. Dit onderzoek werd wederom uitgevoerd met vier veldmonsters met verschillende hoeveelheden en soorten cyanobacteriën. De extractie van het filter bleek alleen efficiënt te werken

als de hoeveelheid cellen in het monster laag was, maar was ongeschikt voor monsters van drijflagen. De met HPLC bepaalde microcystine gehalten waren lager dan de gehalten die met ELISA werden bepaald.

De kwaliteit en de betrouwbaarheid van de ontwikkelde extractiemethode zijn in 2006 nader onderzocht. In eerste aanleg werd er een microscopische controle uitgevoerd op de destructie van verschillende soorten cyanobacteriën na de extractie. Het bleek dat de cellen van de soorten *Microcystis*, *Planktothrix* en *Anabaena* tijdens de extractie in kokend water niet kapot gaan! Wel werden er bij *Microcystis* en *Anabaena* na de extractie kleinere celdiameters waargenomen, waaruit bleek dat een deel van de celinhoud werd uitgescheiden. Bij *Microcystis* werden hiermee ook de microcystines uitgescheiden, maar bij *Anabaena* werd geen verhoogd microcystine gehalte waargenomen na de extractie. Bij *Planktothrix* werd geen effect op de celdiameter waargenomen, maar het microcystine gehalte was ook zonder behandeling meetbaar en nam vrijwel niet toe na de extractie. Om de vergelijkbaarheid van de methode aan te tonen is vervolgens een ringtest met vier verschillende cyanobacteriën monsters uitgevoerd met acht Nederlandse laboratoria. De gemeten microcystine gehalten in de monsters met *Microcystis* dominantie bleken redelijk tot goed overeen te komen voor de verschillende laboratoria. De spreiding was groter bij de monsters waarin *Planktothrix* of *Anabaena* dominant waren.

Op grond van alle resultaten van dit onderzoek lijkt het aanbevolen extractieprotocol betrouwbaar voor monsters met een *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie. Het protocol is echter ongeschikt voor monsters met *Anabaena* dominantie, omdat met dit onderzoek is aangetoond dat alle snelle extractiemethoden die zijn onderzocht minder efficiënt waren dan de Fastner methode. In experiment A1 is aangetoond dat het microcystine gehalte van een mengsel van op de UvA gekweekte cyanobacteriën (*Anabaena*, *Microcystis* en *Planktothrix*) dat was geëxtraheerd met het aanbevolen protocol goed overeen kwam met de gehalten die werden aangetoond na de Fastner extractie. Als de cyanotoxines in *Anabaena* hoog waren, dan zou er een duidelijk verschil zichtbaar moeten zijn tussen deze gehalten. De minder efficiënte extractie van de geringe microcystine hoeveelheden uit *Anabaena* geldt ook voor de andere snelle extractiemethoden, zoals vries-dooi, magnetron en ultrasoon. Daarom is het belangrijk om bij elk geval van algenbloei een monster te onderzoeken op de soortensamenstelling.

Het aanbevolen extractieprotocol wordt als betrouwbaar beschouwd voor monsters met *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie. Het herziene 'Protocol voor de extractie van oppervlaktewater met *Microcystis* of *Planktothrix* dominantie voor de ELISA analyse van microcystines' is als bijlage 2 in dit rapport opgenomen.

DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonodig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n zes miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 030 -2321199.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 8090, 3503 RB Utrecht.

Email: stowa@stowa.nl.

Website: www.stowa.nl

CYANOTOXINE MONITORING: STANDAARDISERING EN VALIDATIE VAN METHODEN VOOR DE NEDERLANDSE WATERKWALITEITSBEHEERders

INHOUD

	TEN GELEIDE	
	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
1	INLEIDING	1
	1.1 Wat is er bekend?	2
	1.2 Wat is er onbekend of onzeker?	3
	1.3 Doel van het project	3
2	PROTOCOL VOOR BEMONSTERING	5
3	UITVOERING ONDERZOEK EXTRACTIE EN MONSTERVERORBEHANDELING	6
	3.1 Experiment A: rendement en reproduceerbaarheid van methoden	6
	3.1.1 Methode 1: MeOH extractie volgens de Fastner methode	6
	3.1.2 Methode 2: ultrasonificeren met probe	7
	3.1.3 Methode 3: koken in waterbad	7
	3.1.4 Methode 4: magnetron extractie	8
	3.1.5 Methode 5: invriezen en ontdooien, gevolgd ultrasoon bad	8
	3.1.6 Methode 6: invriezen en ontdooien, voorafgegaan door malen met blender	8
	3.1.7 Algemene handelingen	8

3.2	Experiment B: optimalisatie van de meest geschikte extractiemethode	9
3.2.1	Variëren kooktijd bij extractie met kokend waterbad (B1)	9
3.2.2	Toevoeging methanol aan extract bij extractie met kokend waterbad (B2)	9
3.2.3	Vaststellen van de noodzaak om het extract te centrifugeren en filtreren (B3)	10
3.2.4	Algemene handelingen	10
3.3	Experiment C: vergelijking extractiemethode voor ELISA en HPLC analyse	11
3.4	Kwaliteitscontrole extractiemethode	12
3.4.1	Microscopische controle extractiemethode met verschillende soorten cyanobacteriën	12
3.4.2	Ringtest microcystine analyse	12
4	RESULTATEN EN CONCLUSIES ONDERZOEK EXTRACTIE EN MONSTERVOORBEREIDING	14
4.1	Experiment A: rendement en reproduceerbaarheid van methoden	15
4.2	Experiment B: optimalisatie van de meest geschikte extractiemethode	20
4.2.1	Optimalisatie van de kooktijd voor het rendement van de celextractie	20
4.2.2	De invloed van methanol toevoeging op het rendement van de extractie	22
4.2.3	Invloed van nabehandelingen van het extract op het extractierendement	24
4.3	Experiment C: vergelijking extractiemethode voor ELISA en HPLC analyse	25
4.4	Kwaliteitscontrole extractiemethode	29
4.4.1	Microscopisch onderzoek	29
4.4.2	Aanvullend onderzoek op veldlocaties met Planktothrix dominantie	30
4.4.3	Ringtest microcystine analyse in cyanobacteriën	31
5	DISCUSSIE	38
6	LITERATUUR	42
	BIJLAGEN	
1	Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de analyse van de algensamenstelling	45
2	Protocol voor de extractie van oppervlaktewater met Microcystis of Planktothrix dominantie voor de ELISA analyse van microcystines	55

1

INLEIDING

Cyanobacteriën (ook blauwalgen genoemd) komen het hele jaar voor in het water, met doorgaans een piek in de (na)zomer. Een combinatie van temperatuur, licht en voedingsstoffen (vooral stikstof en fosfaten) kan aanleiding geven tot een massale groei. In een stabiele waterkolom kunnen drijfvlagen ontstaan van zeer hoge concentraties cyanobacteriën. Omdat van sommige cyanobacteriën bekend is dat ze zeer giftige cyanotoxines kunnen produceren, kan een hoog gehalte aan cyanobacteriën problemen veroorzaken voor mens en milieu (Gezondheidsraad, 2001). Er zijn verschillende soorten cyanotoxines bekend, maar tot op heden zijn in Nederland vooral de zogenaamde microcystines gevonden (RIZA, 2002). Om de mens te beschermen tegen de gevaren van cyanotoxines heeft de Wereld Gezondheid Organisatie (WHO) richtlijnen gegeven voor de maximale gehalten aan microcystines in drinkwater (1 µg/L) en zwemwater (20 µg/L). Het wordt echter aan de beleidsmakers, onderzoekers en laboratoria overgelaten welke procedures moeten worden gebruikt bij de bemonstering, de monstervoorbewerking en de analyse. Er is in de literatuur geen eenduidig protocol voorhanden dat voldoet aan de volgende voorwaarden:

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

Het uiteindelijke doel is om een procedure te vinden die zoveel mogelijk aan de beide voorwaarden voldoet. Als de resultaten van de cyanotoxine monitoring betrouwbaar zijn zullen de adviezen die naar aanleiding van dit onderzoek worden gegeven worden gerespecteerd door zowel zwemmers als exploitanten.

Op dit moment hanteren de provincies het protocol van de Commissie Integraal Waterbeheer (CIW) voor de aanpak van de problemen met cyanobacteriën. Het wordt echter aan de Waterkwaliteitsbeheerders, die verantwoordelijk zijn voor de beoordeling van het oppervlaktewater, overgelaten hoe de monitoring van toxines van cyanobacteriën wordt uitgevoerd. De Waterkwaliteitsbeheerder moet de provincie, die verantwoordelijk is voor de volksgezondheid, informeren over de risico's van giftige stoffen in het zwemwater. Het is daarom wenselijk dat, in aanvulling van het CIW protocol "Veilig zwemmen: cyanobacteriën in zwemwater", een uitgewerkte beschrijving wordt opgesteld voor de bemonstering van oppervlaktewater, de celextractie van cyanobacteriën, de monsterbehandeling en de analyse van cyanotoxines.

1.1 WAT IS ER BEKEND?

In principe dient het totale gehalte aan microcystines in een monster te worden bepaald, d.w.z. het gehalte in het water (extracellulair) en in de bacteriën (intracellulair). De voorbehandeling van een monster is afhankelijk van de te gebruiken analysemethode. Bij een HPLC-analyse wordt meestal alleen het intracellulaire gehalte van een filtraat van het water bepaald, omdat gebleken is dat de extracellulaire concentraties in het algemeen zeer laag zijn en een tijdrovende concentrering van het water noodzakelijk is. Bij gevoeliger methoden, zoals de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) en PIA (phosphatase inhibition assay), is het eenvoudiger om de totaal gehalten aan microcystines te meten. Bij alle methoden is het nodig om de bacteriën kapot te maken zodat de microcystines vanuit de cel in oplossing worden gebracht.

In de literatuur worden verschillende methoden gevonden voor de extractie van oppervlaktewater met cyanobacteriën. Verschillende vloeistof-vloeistofextracties zijn beschreven, waarvan die met 5% azijnzuur, methanol, (puur, aangezuurd of waterig) en butanol:methanol:water (1:4:15) volgens Harada (1996) het meest worden gebruikt. Het is moeilijk een universele methode te vinden die voor alle cyanotoxines met verschillende polariteit even goed werkt omdat dit sterk afhangt van het oplosmiddel. De beste methode voor microcystine LR (waarbij meer dan 99% in oplossing komt) is waarschijnlijk een methanol:water (3:1) extractie van gevriesdroogde cellen na drie maal destructie met ultrasoon geluid (Fastner et al., 1998). Deze methode is echter arbeidsintensief, en daardoor minder geschikt voor analyses waarbij het resultaat snel bekend moet zijn. Bij gebruik van een zogenaamde beadbeater kunnen met de Fastner methode 24 monsters op een dagdeel worden opgewerkt, maar daarvoor is nog wel een droogvries stap noodzakelijk.

Een aantal vereenvoudigde extractiemethoden met geïsoleerde cellen die werden geresuspendeerd in schoon water zijn onderzocht door Metcalf en Codd (2000). De cellen werden kapotgemaakt met ultrasoon geluid (ultrasone probe), magnetron (minimaal 9 minuten) of kokend water (minimaal 1 minuut). Alle methoden lijken geschikt voor dit werk, hoewel de ultrasoon methode een iets lagere opbrengst gaf dan de andere twee methoden. Uit HPLC analyse en een fosfaatremming bioassay bleek dat de microcystines niet waren aangetast door de voorbehandelingen. In plaats van een ultrasoon probe wordt ook gebruik gemaakt van een ultrasoon bad, maar deze methode lijkt minder efficiënt (Krot en Visser, 2003). Een andere simpele methode die weinig specifieke apparatuur vereist is de destructie met vriezen en dooien (Utkilen and Gjølme, 1994). Als de vries/dooi stap drie maal wordt herhaald moeten vrijwel alle algencellen kapot zijn (Meulenberg, 2000), al zal dit afhangen van de soortensamenstelling van het monster. Een volledige desintegratie van alle soorten cyanobacteriën wordt verkregen door de vries/dooi methode te combineren met een hoge druk "French pressure cell" (Rixt Hovenkamp, HHNK, persoonlijke mededeling). In het protocol van het CIW worden vier van de bovenvermelde methoden als geschikt beoordeeld: 1) een vloeistofextractie van drooggevroren materiaal (Fastner et al., 1998) en de snellere extracties met 2) ultrasonificatie, 3) magnetron en 4) kokend waterbad (Metcalf en Codd, 2000). Op dit moment wordt er een ISO norm voorbereid over de microcystine analyse, waarbij solid phase extraction (SPE) wordt gebruikt als concentratietechniek voor een HPLC-UV analyse. De methode die met het onderzoek van het huidige projectvoorstel wordt ontwikkeld kan in de toekomst worden getoetst aan deze ISO norm.

Veelvuldig gebruik van plastic materialen (pipetpuntjes, eppendorf vials etc.) kan leiden tot onderschatting van de cyanotoxine gehalten doordat de toxines zich aan dit materiaal kunnen binden (Hyenstrandt et al., 2001). Toevoeging van methanol aan het monster zal de binding aan plastics verminderen, maar een te hoge methanol concentratie kan de ELISA analyse verstoren (Metcalf et al., 2000).

1.2 WAT IS ER ONBEKEND OF ONZEKER?

De meeste methoden zijn getest met suspensies van geïsoleerde cellen, zodat alleen de intracellulaire cyanotoxines worden bepaald. Het is de vraag in hoeverre de protocollen moeten worden aangepast als het hele watermonster in behandeling wordt genomen zodat ook de extracellulaire fractie wordt meegenomen. Omdat bij een HPLC analyse uitsluitend de intracellulaire fractie wordt geanalyseerd zal hiermee bij een vergelijkend onderzoek rekening moeten worden gehouden. Hoewel uit onderzoek van Metcalf en Codd (2000) bleek dat de microcystines niet werden aangetast door hoge temperaturen zijn er aanwijzingen dat de eiwitstructuren van microcystines denatureren bij temperaturen boven 40°C (Penders, persoonlijke mededeling). Dit zal nader onderzocht moeten worden.

Er is geen literatuur gevonden waarin de vries/dooi methode wordt vergeleken met de andere methoden. Uit eigen onderzoek van Waternet bleek dat de vries/dooi methode beter werkt dan extractie in een ultrasoon bad (niet gepubliceerde data). De vergelijkingen met een kokend waterbad zijn bij Waternet niet eenduidig omdat er soms een hoger gehalte en soms een lager gehalte werd gevonden. Bij de magnetron extractie bleek het lastig om verdamping van het monster tegen te gaan. Daarom zal na de extractie moeten worden aangevuld tot het uitgangsvolume. De indruk bestaat dat de bovenstaande snelle methoden niet altijd even efficiënt werken. Er is weinig bekend over de reproduceerbaarheid en de herhaalbaarheid van het rendement waarmee de cyanotoxines met verschillende extractiemethoden uit de monsters zijn geëxtraheerd.

Er is niet bekend in hoeverre de binding van cyanotoxines aan plastic materialen in de praktijk leidt tot een onderschatting van de gemeten gehalten. Toevoeging van methanol (MeOH) aan het water zal deze binding gedeeltelijk voorkomen, maar MeOH concentraties boven de 5% kunnen de ELISA analyse verstoren (Mels, 2001). Penders (ongepubliceerde resultaten) heeft echter aangetoond dat MeOH concentraties van 10% geen invloed hebben op de ELISA analyse. Omdat de extracten met water worden verdund voor de uiteindelijke ELISA analyse zullen de MeOH concentratie in het eindextract afnemen. Ondanks de vele literatuur over dit onderwerp zijn de optimale omstandigheden bij de opwerking van waterige monsters nog niet goed beschreven.

1.3 DOEL VAN HET PROJECT

Het doel van het project dat is ingediend namens de werkgroep cyanobacteriën is het opstellen van een gedetailleerd protocol (binnen de randvoorwaarden van het CIW protocol) waarmee alle provincies en alle Waterkwaliteitsbeheerders de problemen met cyanobacteriën in open zwemwater ondubbelzinnig en op een vergelijkbare manier in kaart kunnen brengen. Dit project moet een gestandaardiseerd microcystine monitoring protocol opleveren dat door alle Nederlandse Waterkwaliteitsbeheerders kan worden toegepast.

Het bestaat uit:

- *Bemonsteringsprotocol*. Drijfslagen en toxines zijn zeer dynamisch en kunnen variëren over het oppervlak en de diepte van oppervlaktewater. Het is van belang dat er eenduidigheid bestaat in de bemonstering van het oppervlaktewater.
- *Analyseprotocol*. De celextractie die microcystines uit de cel beschikbaar maakt voor analyse is van zeer groot belang voor het eindresultaat van de analyse. Bij gebruik van een verkeerde extractiemethode wordt het cyanotoxine gehalte (en het gevaar voor de zwemmer) onderschat. Door vergelijking van verschillende methoden om de algencellen in oppervlaktewater kapot te maken zal de meest betrouwbare methode om zowel de intracellulaire als de extracellulaire cyanotoxines in een waterige oplossing te krijgen worden geselecteerd. De methode zal simpel (geen geavanceerde apparatuur) en snel (maximaal een dagdeel voor een serie van 10 monsters) moeten zijn.
- *Validatie* van een aantal prestatiekenmerken naar aanleiding van twee ringonderzoeken.

Met de uitkomsten van een volgens dit protocol uitgevoerde cyanotoxine monitoring moeten de provincies eenduidig kunnen bepalen of er gevaarlijke microcystine concentraties in het water aanwezig zijn. Indien Waterkwaliteitsbeheerders de analyse uit laten voeren door een commercieel laboratorium moet als voorwaarde worden gesteld dat het protocol dat met dit project wordt vastgesteld wordt gehanteerd. Omdat microcystine niet de enige gifstof is die door blauwalgen wordt geproduceerd is er inmiddels door de werkgroep cyanobacteriën een nieuw blauwalgen protocol vastgesteld, waarbij het instellen of opheffen van een zwembod afhankelijk is van het aantal cellen. De microcystine analyse kan echter optioneel worden toegepast om de risico's te analyseren op locaties met een dominantie van *Microcystis* of *Planktothrix*.

2

PROTOCOL VOOR BEMONSTERING

Volgens het CIW protocol is een zwemlocatie verdacht als er A. gezondheidsklachten optreden, B. drijflagen of algenwolken worden waargenomen, of C. in het verleden problemen zijn geweest met cyanobacteriën en er andere mogelijke aanwijzingen zijn (stank, hoog chlorofyl). In de gevallen A en B is het duidelijk dat er meteen een monster moet worden genomen voor de analyse van microcystines. In geval C is het onduidelijk wanneer precies moet worden begonnen met de bemonstering. Het is bovendien niet duidelijk wanneer, waar en hoe en hoe vaak een monster moet worden genomen.

De werkgroep Cyanobacteriën heeft in 2005 een concept bemonsteringsprotocol geschreven waarin de strategie en de uitvoering van de bemonstering zijn weergegeven. Aan het begin van het zwemseizoen zijn deze richtlijnen per e-mail naar de betrokken medewerkers bij de Waterschappen en de provincies verstuurd. De werkgroep heeft hierbij het verzoek gedaan om dit protocol in de zomer van 2005 voor zover mogelijk te gebruiken. In een later stadium is de medewerkers gevraagd of met dit protocol goed valt te werken en of er voorstellen voor aanpassing zijn. Begin 2006 heeft de werkgroep cyanobacteriën aan de hand van een vragenlijst de reacties geëvalueerd van de gebruikers (waterschappen, provincies en Rijkswaterstaat) en het concept aangepast tot een definitief protocol. Het definitieve voorschrift "Protocol voor het nemen van oppervlaktewatermonsters voor onderzoek naar toxines van cyanobacteriën en voor de globale bepaling van de algensamenstelling" is als bijlage 1 opgenomen in dit rapport.

3

UITVOERING ONDERZOEK EXTRACTIE EN MONSTERVOORBEHANDELING

Omdat de zomer van 2005 niet warm was wilden de cyanobacteriën aanvankelijk niet hard groeien. Toen het weer in augustus verbeterde werden er echter op verschillende locaties wel drijflagen of cyanodominantie waargenomen. Experiment A, een onderzoek naar rendement en reproduceerbaarheid van verschillende snelle extractie methoden is in september 2005 afgerond. Experiment B, een optimalisatie van de in experiment A geselecteerde methode, is voor het grootste deel uitgevoerd in 2005. Omdat er na de uitvoering van de experimenten in 2005 nog een aantal vragen waren over de meest optimale extractiemethode werden er in 2006 vervolgprouven gedaan om de methode verder te verfijnen zonder dat dit ten koste gaat van het rendement en de reproduceerbaarheid van de extractie. De kwaliteit van de extractie was in 2005 uitsluitend beoordeeld op grond van de microcystine gehalten van het eindextract. Daarom is in 2006 met een microscopisch onderzoek bestudeerd in hoeverre de geoptimaliseerde methode geschikt is om de verschillende soorten cyanobacteriën te vernietigen en zo de toxines in oplossing te brengen.

3.1 EXPERIMENT A: RENDEMENT EN REPRODUCEERBAARHEID VAN METHODEN

In dit experiment werden 5 simpele methoden voor celextractie vergeleken met de betrouwbare Fastner methanol (MeOH) extractie (Fastner et al., 1998). Van de Fastner methode is bekend dat het extractierendement voor microcystine ca. 99% is. Het doel van deze proef is om te onderzoeken in hoeverre de 5 simpele methoden voor niet geconcentreerde monsters van het oppervlaktewater (cellen plus omringend water) vergelijkbaar zijn met de Fastner methode. De proef werd uitgevoerd met een mengsel van op de UvA gekweekte cellen (A1) en drie veldmonsters:

- A 1 UvA kweek
- A 2 Alkmaardermeer
- A 3 Naardermeer
- A 4 Vinkeveense plassen & Vecht

3.1.1 METHODE 1: MEOH EXTRACTIE VOLGENS DE FASTNER METHODE

- 5.0 ml van het homogene monster wordt over een 25 mm doorsnee 0.45 µm filter gefiltreerd
- Het filter wordt in een 2 ml Eppendorf vial met schroefdop in vloeibare stikstof bevroren
- Het monster wordt overnacht drooggevroren in een droogvriesapparaat

1^e extractie:

- Er wordt 1.75 ml 75% MeOH en een laag 0.5 mm “beads” aan de vial toegevoegd
- De monsters worden 60 sec bij 5000 rpm geschud in een beadbeater (goede oorbescherming!)

- De monsters worden 5 minuten in een ultrasoon bad getrild
- De monsters worden 20 minuten geschud op een schudmachine
- De monsters worden 2 maal 5 minuten afgedraaid bij 13.000 rpm op een tafelcentrifuge. Tussen de 2 runs worden de monsters 180° omgedraaid
- De bovenstaande vloeistof (supernatant) wordt met een pasteurpipet afgezogen en bewaard in een gecodeerde glazen 10 ml buis (met schaalverdeling); de vials met de pellet worden bewaard voor de 2^e en 3^e extractie

2^e en 3^e extractie:

- ER wordt 1.5 ml 75% MeOH aan de vials van de 1^e extractie (de pellet) toegevoegd
- De monsters worden 20 sec bij 5000 rpm geschud in een beadbeater (goede oorbescherming!).
- De monsters worden 5 minuten in een ultrasoon bad getrild
- De monsters worden 20 minuten geschud op een schudmachine
- De monsters worden 2 maal 5 minuten afgedraaid bij 13.000 rpm op een tafelcentrifuge. Tussen de 2 runs worden de monsters 180° omgedraaid.
- De bovenstaande vloeistof (supernatant) wordt met een pasteurpipet afgezogen en bewaard in dezelfde glazen buizen van de eerste extractie, en de procedure wordt herhaald voor de vials met de pellet voor de 3^e extractie

Verdunning:

- Het extract wordt drooggedampt onder stikstof op een heaterblok (40°)
- Het extract wordt opgelost in 5 ml schoon water
- Het MC gehalte van een aantal verdunningen wordt bepaald met de ELISA assay. Het gehalte dat in het extract van deze methode wordt gemeten wordt gebruikt om de verdunning van de extracten van de overige methoden te bepalen (zie onder)

3.1.2 METHODE 2: ULTRASONIFICEREN MET PROBE

- 5.0 ml van het homogene monster wordt in een kunststof buis van 15 ml gebracht; de buis wordt in een bekerglas met ijs geplaatst
- De ultrasoon probe wordt in de vloeistoflaag in het flesje gestoken en er wordt 1 minuut op vol vermogen getrild (goede oorbescherming!)
- Het afgekoelde extract wordt gefiltreerd en verdund volgens de onderstaande methoden

3.1.3 METHODE 3: KOKEN IN WATERBAD

- 2.0 ml van het homogene monster wordt overgebracht in een 3,5 ml cryo-vial; de vial wordt afgesloten met een schroefdop
- Een bekerglas water (met kooksteentjes) wordt aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat
- De cryo-vials met monster worden met een piepschuim rekje in het kokende water gehangen zodanig dat het monstermateriaal zich volledig onder het wateroppervlak bevindt
- De monsters worden 20 minuten gekookt in het waterbad en daarna aan de lucht afgekoeld
- Het afgekoelde extract wordt gefiltreerd en verdund volgens de onderstaande methoden

3.1.4 METHODE 4: MAGNETRON EXTRACTIE

- 10 ml van het homogene monster wordt overgebracht in een teflon magnetron vial, die ook wordt gebruikt voor extractie van zware metalen monsters
- De monsters worden 5 minuten voorverwarmd en vervolgens 10 minuten bij vol vermogen in de magnetron geplaatst en daarna aan de lucht afgekoeld
- Het afgekoelde extract wordt gefiltreerd en verdund volgens de onderstaande methoden

3.1.5 METHODE 5: INVRIEZEN EN ONTDOOIEN, GEVOLGD ULTRASOON BAD

- Ongeveer 10 ml van het homogene monster wordt in een 15 ml buis ingevroren in de -25 °C vriezer
- Het monster wordt ontdooid in lauw/warm water
- Na ontdooien wordt het monster wederom ingevroren
- De vries-ontdooi stap wordt in totaal 3 maal uitgevoerd
- Het monster wordt na de laatste vries/dooi-stap 30 minuten in een ultrasoonbad geplaatst
- Het extract wordt gefiltreerd en verdund volgens de onderstaande methoden

3.1.6 METHODE 6: INVRIEZEN EN ONTDOOIEN, VOORAFGEGAAN DOOR MALEN MET BLENDER

- Voor de behandeling wordt het homogene monster 1 minuut gemalen in een Waring Blender (vol vermogen)
- Ongeveer 10 ml van het gemalen monster wordt in een 15 ml buis ingevroren in de -25 °C vriezer
- Het monster wordt ontdooid in lauw/warm water
- Na ontdooien wordt het monster wederom ingevroren
- De vries-ontdooi stap wordt in totaal 3 maal uitgevoerd
- Het extract wordt gefiltreerd en verdund volgens de onderstaande methoden

3.1.7 ALGEMENE HANDELINGEN**HOMOGENISEREN:**

- Een literfles met ca. 700 ml water met cyanobacteriën wordt 1 minuut krachtig geschud.
- Van het homogene monster worden in totaal 24 porties van 10 ml afgenomen. Per methode worden 4 steriele 15 ml buizen gevuld met 10 ml van het monster. Na elke 4 buizen wordt het monster opnieuw ca. 10 seconden geschud om het homogeen te houden.
- Voor methode 6 wordt de suspensie 1 minuut in een Waring blender gehomogeniseerd.

Elk van de monsters A1-A4 is na homogenisatie in 24 gelijke porties verdeeld. Alle monsters werden in viervoud geëxtraheerd met elk van de hierboven beschreven methoden:

FILTRATIE VAN DE EXTRACTEN

Breng het gedestruëerde monster (maximaal 10 ml) in een 10 ml plastic spuit. Filtreer het monster over een 0,45 µm filter. De eerste vloeistof die door het filter komt wordt weggegooid en van de rest wordt ca. 1,5 ml als monster opgevangen in een gecodeerd Eppendorf vaatje (2 ml).

VERDUNNING VAN DE GEFILTREERDE EXTRACTEN

Voordat de hele serie wordt verdund moet er eerst een test worden uitgevoerd met het via methode 1 verkregen extract bij verschillende verdunningen. De verdunning moet zodanig worden bepaald dat het gehalte van het met methode 1 verkregen extract op ca. 1 µg/L (in het

midden van de 0.1-1.6 µg/L ijklijn) uitkomt: de verdunning is dus ongeveer gelijk aan het met methode 1 bepaalde gehalte [µg/L].

MC ELISA ANALYSES

De verdunde extracten worden op cyanotoxines geanalyseerd met de ELISA methode volgens het standaard protocol van de SDI Enviroguard kit.

3.2 EXPERIMENT B: OPTIMALISATIE VAN DE MEEST GESCHIKTE EXTRACTIEMETHODE

Hoewel in de literatuur de tijden zijn beschreven waarop de algencellen volledig kapotge maakt zijn blijkt in de praktijk dat hierin (mogelijk afhankelijk van de dichtheid) nogal wat variatie kan bestaan. Daarom zal van de beste snelle methode die met experiment A werd gevonden (methode 3: koken in waterbad), worden onderzocht of langere extractietijden leiden tot een hogere cyanotoxine opbrengst en/of een betere reproduceerbaarheid. Omdat deze proeven aan het einde van het seizoen werden uitgevoerd kon niet worden gewacht op 4 verschillende monsters. Er wordt voor deze proef 1 monster met een hoge concentratie cyanobacteriën gebruikt, dat in 4 verschillende verdunningen (met demiwater: 100%, 10%, 1% en 0.1%) wordt opgewerkt voor het testen van de optimale kooktijd.

B1.1-B1.4 Vinkeveen (dorp)

Om de invloed van binding aan plastics te onderzoeken is onderzocht of toevoeging van methanol aan het monster de efficiëntie van de extractie verhoogt. De monsterverdunningen worden overnacht in de koelkast bewaard. De volgende dag worden drie verdunningen bij de optimale kooktijd gedestruerd, na toevoeging van respectievelijk 50% methanol en 50% demi water. Voor dit experiment werden drie verschillende verdunningen van het monster uit Vinkeveen gebruikt:

B2.1-B2.3 Vinkeveen (dorp)

3.2.1 VARIËREN KOOKTIJD BIJ EXTRACTIE MET KOKEND WATERBAD (B1)

- 2.0 ml van het monster wordt overgebracht in een 3,5 ml cryo-vial; de vial wordt afgesloten met een schroefdop
- Een bekglas water (met kooksteentjes) wordt aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat
- De cryo-vials met monster worden met een piepschuim rekje in het kokende water gehangen zodanig dat het monstermateriaal zich volledig onder het wateroppervlak bevindt
- De monsters worden 20, 40 en 60 minuten gekookt in het waterbad en daarna aan de lucht afgekoeld
- Het afgekoelde extract wordt volgens onderstaande methoden gefiltreerd en met demiwater verdund voor de ELISA assay

3.2.2 TOEVOEGING METHANOL AAN EXTRACT BIJ EXTRACTIE MET KOKEND WATERBAD (B2)

- 5.0 ml van het monster wordt verdund met resp. 5.0 ml methanol en 5.0 ml demi water.
- 2.0 ml van het verdunde monster wordt overgebracht in 3,5 ml cryo-vials; de vials worden afgesloten met een schroefdop.
- Een bekglas water (met kooksteentjes) wordt aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat
- De cryo-vials met monster worden met een piepschuim rekje in het kokende water gehangen zodanig dat het monstermateriaal zich volledig onder het wateroppervlak bevindt

- De monsters worden 30 minuten gekookt in het waterbad en daarna aan de lucht afgekoeld
- Het afgekoelde extract wordt volgens onderstaande methoden gefiltreerd en met demiwater verdund voor de ELISA assay

3.2.3 VASTSTELLEN VAN DE NOODZAAK OM HET EXTRACT TE CENTRIFUGEREN EN FILTEREN (B3)

Twee verschillende monsters werden in twaalfvoud geëxtraheerd (drie extracten per nabehandeling).

- 1.0 ml van het monster en 1.0 ml methanol worden overgebracht in een 3,5 ml cryo-vial; de vial wordt afgesloten met een schroefdop
- Een bekeerglas water (met kooksteentjes) wordt aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat
- De cryo-vials met monster worden met een schuimrubber rekje in het kokende water gehangen zodanig dat het monstermateriaal zich volledig onder het wateroppervlak bevindt
- De monsters worden 30 minuten gekookt in het waterbad en daarna aan de lucht afgekoeld
- Het afgekoelde extract wordt op de onderstaande manieren nabehandeld voor de ELISA analyse:
 - F&C: filtreren over 0,45 µ filter en 5 minuten centrifugeren bij 13.000 rpm
 - F: filtreren over 0,45 µ filter
 - C: 5 minuten centrifugeren bij 13.000 rpm
 - N: geen nabehandeling

3.2.4 ALGEMENE HANDELINGEN

HOMOGENISEREN:

- Een fles met 250 ml water met cyanobacteriën wordt 1 minuut krachtig geschud.
- Van het homogene monster worden in totaal 4 porties van 10 ml afgenomen. Per methode worden 4 steriele 15 ml buizen gevuld met 10 ml van het monster. Telkens wordt na het vullen van 4 buizen het monster opnieuw ca. 10 seconden geschud om het homogeen te houden.
- De monsters worden volgens de onderstaande methoden in viervoud gedestruëerd.

FILTRATIE VAN DE EXTRACTEN

Breng het gedestruëerde monster (maximaal 10 ml) in een 10 ml plastic spuit. Filtreer het monster over een 0,45 µm filter. De eerste vloeistof die door het filter komt wordt weggegooid en de rest wordt als monster opgevangen in een gecodeerd Eppendorf vaatje (2 ml).

VERDUNNING VAN DE GEFILTREERDE EXTRACTEN

Voordat de hele serie wordt verdund moet er eerst een test worden uitgevoerd met het extract bij verschillende verdunningen. De verdunning van de serie moet zodanig worden bepaald dat het gehalte van het extract op ca. 1 µg/L (in het midden van de 0.1-1.6 µg/L ijklijn) uitkomt.

MC ELISA ANALYSES

De verdunde extracten worden op cyanotoxines geanalyseerd met de ELISA methode volgens het standaard protocol van de SDI Enviroguard kit.

3.3 EXPERIMENT C: VERGELIJKING EXTRACTIEMETHODE VOOR ELISA EN HPLC ANALYSE

De snelle opwerkingsmethode zal bij voorkeur geschikt moeten zijn voor zowel ELISA als HPLC analyse. Daarom is in dit onderdeel een vergelijkend onderzoek uitgevoerd de kokend water extractie voor de beide analyse methoden. Vier verschillende monsters werden in viervoud opgewerkt volgens de onderstaande procedure van de aangepaste extractie:

- C1: Kinselmeer, 10 ml
- C2: Sloterplas, 5 ml
- C3: Ursemmermeer, 20 ml
- C4: Alkmaardermeer, 5 ml

Aan de extractie procedure is een concentratiestap door filtratie toegevoegd omdat de HPLC analyse minder gevoelig is dan de ELISA analyse.

- Afhankelijk van de dichtheid van het monster wordt 5, 10 of 20 ml gefiltreerd over een 0.45 μ nitrocellulose filter
- Het filter wordt met een pincet opgevouwen en overgebracht in een 3,5 ml cryo-vial
- Aan de cryo-vial met het filter worden 1.0 ml demiwater en 1.0 ml methanol toegevoegd; de vial wordt afgesloten met een schroefdop
- Een bekersglas water (met kooksteentjes) wordt aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat
- De cryo-vials met de filters worden met een schuimrubber rekje in het kokende water gehangen zodanig dat het monstermateriaal zich volledig onder het wateroppervlak bevindt
- De monsters worden 30 minuten gekookt in het waterbad en daarna aan de lucht afgekoeld
- De vloeistof uit de afgekoelde cryo-vial wordt met een pasteurpipet overgebracht in een 2 ml Eppendorf vial

Met deze methode is niet het totaal, maar alleen het intracellulaire microcystine geëxtraheerd. Om het effect van deze extra stap op het extractierendement te controleren zijn dezelfde monsters voor ELISA analyse zowel met als zonder de filtratiestap in viervoud geanalyseerd. Daarnaast is het microcystine gehalte van het gefiltreerde water bepaald met een ELISA analyse.

MC ELISA ANALYSES

De verdunde extracten worden op cyanotoxines geanalyseerd met de ELISA methode volgens het standaard protocol van de SDI Enviroguard kit.

MC HPLC ANALYSES

Deze extracten waren niet helder en zijn voor de HPLC monsters verder nabehandeld:

- Het extract filtreren over een 0.45 μ filter
- De gefiltreerde vloeistof wordt bij 40°C ingedampt onder een lichte stikstofstroom
- De ingedampte monsters worden gekoeld naar de UvA gebracht voor HPLC analyse
- De ingedampte monsters worden opgelost in 600 μ l 50% methanol
- De oplossing wordt 5 minuten gecentrifugeerd bij 13.000 rpm

De extracten werden op microcystines geanalyseerd met high performance liquid chromatography met fotodiode array detectie (HPLC-DAD, Kontron Instruments). De stoffen werden gescheiden op een LiChrospher 100 ODS RP 5 μ m LiChorCART 250-4 kolom, met een gradiënt van 30% tot 70% acetonitril in water met 0,05% trifluorazijnzuur. De loopsnelheid

van de vloeibare fase was 1 ml per minuut. De verschillende microcystines werden geïdentificeerd op basis van hun karakteristieke UV-spectra en gekwantificeerd met behulp van LR-MC en RR-MC standaarden.

3.4 KWALITEITSCONTROLE EXTRACTIEMETHODE

3.4.1 MICROSCOPISCHE CONTROLE EXTRACTIEMETHODE MET VERSCHILLENDE SOORTEN CYANOBACTERIËN

Drie soorten cyanobacteriën (*Microcystis*, *Anabaena* en *Planktothrix*) die gekweekt waren op de Universiteit van Amsterdam (UvA) werden:

- A. volgens het standaard protocol geëxtraheerd in kokend water
- B. zonder voorbehandeling 1:1 verdund met demiwater

Zowel de voorbehandelde als de niet voorbehandelde cellen werden onder de microscoop onderzocht. Daarnaast werd het microcystine gehalte van deze monsters gemeten met een ELISA analyse.

3.4.2 RINGTEST MICROCYSTINE ANALYSE

In aanvulling op een internationale microcystine ringtest met microcystine oplossingen, georganiseerd door de Universiteit van Catalonië (Barcelona, Spanje), is een eigen ringtest georganiseerd voor de microcystine analyse in monsters met cyanobacteriën. Het onderzoek is uitgevoerd met vier monsters:

- 1 UvA kweek *Microcystis*
- 2 UvA kweek *Planktothrix*
- 3 Sloterplas (*Microcystis* dominantie)
- 4 Geestmerambacht (*Anabaena* dominantie)

UITVOERING

De monsters werden goed gehomogeniseerd en in porties van 20 ml ingevroren bij -80°C . De monsters werden op droogijs verstuurd naar acht deelnemende laboratoria, waar ze bij aankomst werden ingevroren totdat de extractie en de analyse werden uitgevoerd. Elk laboratorium extraheerde de monsters volgens de op het lab gebruikte methode en volgens de in bijlage 2 beschreven methode, en analyseerde de monsters met de ELISA assay. De monsters moesten ten minste eenmaal worden geëxtraheerd (met duplo analyse). Optioneel konden meerdere extracties worden uitgevoerd die individueel gerapporteerd moesten worden. Alle aan de ringtest deelnemende laboratoria maakten gebruik van de SDI Enviroguard kit ELISA assay (Lotnummer 1F1074). Laboratorium 5 gebruikte een eigen microcystine standaard in plaats van de bij de kit geleverde MC-surrogaten.

DATA ANALYSE

Van elk monster werden het gemiddelde voor alle laboratoria, de absolute en relatieve standaard deviaties en de minimale en maximale waarden bepaald. De resultaten van de laboratoria die meerdere extracties hadden uitgevoerd werden gemiddeld. Ook van deze waarden zijn de gemiddelden en standaard deviaties per monster bepaald.

CLASSIFICATIE VAN RESULTATEN

Met de gemiddelde resultaten van de analyses kunnen de zogenaamde Z-scores worden bepaald. Met de Z-score worden de data geïnclassificeerd met betrekking tot de afwijking van het gemiddeld gevonden resultaat (mean), afhankelijk van de standaard deviatie (sd). De Z-score wordt bepaald met de formule:

$$Z = \frac{X_{\text{lab}} - \text{mean}}{\text{sd}}$$

waarin X_{lab} het (gemiddeld) waargenomen microcystine gehalte is.

Met de Z-scores kunnen de resultaten voor elk monster worden geëvalueerd. Hoe dichterbij de Z-score bij nul ligt, hoe beter het resultaat is. De kwaliteit van de analyse wordt vastgesteld aan de hand van de volgende criteria:

- $0 < |Z| < 2$: acceptabele waarde
- $2 < |Z| < 3$: twijfelachtige waarde
- $|Z| > 3$: niet-acceptabele waarde

Hierin is $|Z|$ de absolute waarde is van de Z-score (= de 'afstand' tot nul).

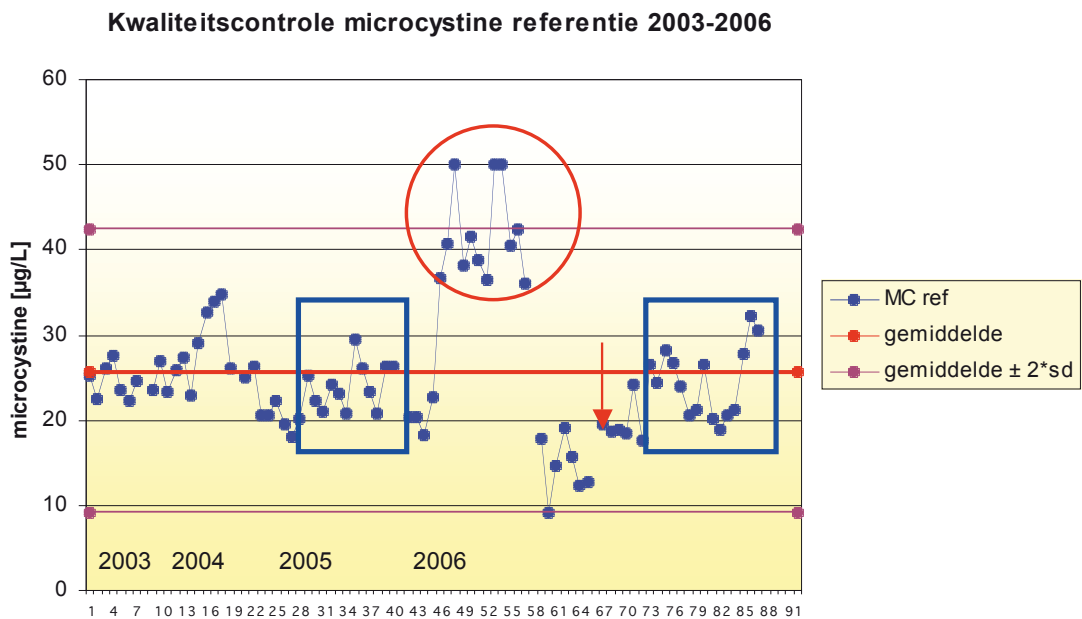
4

RESULTATEN EN CONCLUSIES ONDERZOEK

EXTRACTIE EN MONSTERVOORBEREIDING

De kwaliteit van de ELISA analyse van microcystines is regelmatig gecontroleerd. Er werd een interne kwaliteitscontrole van de analyse uitgevoerd met een door het Waterproef laboratorium gemaakt referentiemonster, dat in kleine porties bij -25° werd bewaard. De resultaten van de analyses van het referentiemonster van 2003 tot en met 2006 zijn weergegeven in Figuur 1. De resultaten van de analyses die werden uitgevoerd tijdens het in dit rapport beschreven onderzoek zijn blauw omkaderd.

FIGUUR 1 RESULTATEN VAN DE KWALITEITSCONTROLE VAN DE MICROCYSTINE ELISA ANALYSE MET EEN MICROCYSTINE POSITIEVE CONTROLE (MC PC) REFERENTIE MONSTER VAN 2003 T/M 2006; DE ANALYSES VAN DE ONDERZOEKEN VAN DIT RAPPORT IN 2005 EN 2006 WERDEN BINNEN DE BLAUWE KADERS UITGEVOERD; RODE PIJL IS EEN VERSE MC REFERENTIE



Uit de grafiek van Figuur 1 blijkt dat het gemeten gehalte van het referentiemonster behoorlijk kan variëren. De resultaten van de kwaliteitscontrole in 2004 en 2006 waren bijvoorbeeld minder eenduidig dan die in 2005. De extreem hoge gehalten in de rode cirkel werden veroorzaakt door een foute batch van de SDI Enviroguard ELISA kits in 2006, waarbij de concentraties van de microcystine-LR (MC-LR) surrogaat standaard oplossingen te laag waren. Hierna is bij Waterproef besloten om bij elke serie metingen een analyse van het referentiemonster mee te nemen.

Met de interne validaties bij het bedrijf Elti Support werd ook aangetoond dat de SDI Enviroguard microcystine kit niet constant dezelfde kwaliteit heeft (Peelen, 2005). In 2004 werd

door Peelen een intra-assay variantie (spreiding in een meervoudig ingezet monster tijdens dezelfde assay) van 14% gevonden, terwijl een intra-assay variantie van 4% normaal is. Evenals de Waterproef data (Figuur 1) verschilden de gemiddelde concentraties die door Peelen in een controlemonster werden gemeten per jaar. De lineariteit van de analyse, gemeten in meervoudige verdunningen van een monster met een hoog microcystine gehalte, bleek goed te zijn. Ondanks dat SDI interne controles uitvoert om de kwaliteit van de geproduceerde kits te testen blijkt de betrouwbaarheid van de ELISA assay niet altijd goed te zijn. Om een meer constante kwaliteit van de analyse te garanderen verdient het daarom aanbeveling om zelf een MC-LR standaard aan te schaffen en deze te gebruiken in plaats van de bij de kits geleverde MC-LR surrogaatstandaarden. Dit heeft als nadeel dat de toxiciteit van echt MC-LR hoger is dan die van de door SDI geleverde MC-LR surrogaten.

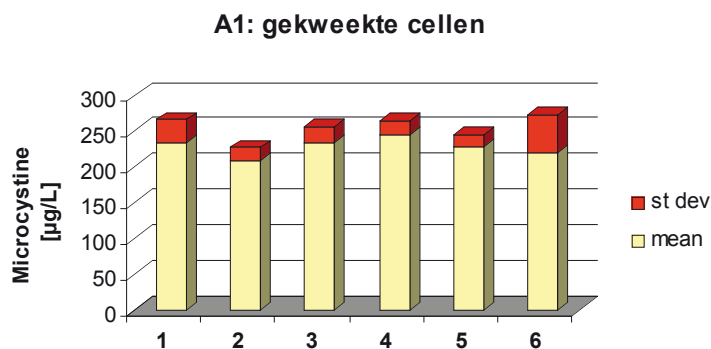
4.1 EXPERIMENT A: RENDEMENT EN REPRODUCEERBAARHEID VAN METHODEN

De resultaten van de microcystine analyses van experiment A zijn weergegeven in Tabel 1 en de gemiddelden met standaard deviatie zijn uitgezet in de Figuren 2, 3, 4 en 6.

Op de Universiteit van Amsterdam (UvA) zijn drie kweken van cyanobacteriën ingezet. Na een kweektijd van 3 weken werden de kweken in ongeveer gelijke hoeveelheden gecombineerd tot een mengmonster van *Microcystis*, *Anabaena* en *Planktothrix*. In Figuur 2 is te zien dat er in dit monster geen grote verschillen tussen het rendement van de extractiemethoden zichtbaar zijn. Methode 3 (ultrasoon probe) heeft een iets lagere opbrengst als de overige methoden. Het is mogelijk dat de gekweekte bacteriën een minder taaie wand hebben dat in het veld gevonden soorten, waardoor de extractie gemakkelijker gaat (Rixt Hovenkamp, HHNK, persoonlijke mededeling). Bovendien moesten de monsters voor methoden 2 t/m 5 enkele dagen in de vriezer worden bewaard waardoor een deel van de cellen al kapot was voor de opwerking. De reproduceerbaarheid in dit monster was het minst goed bij de methoden 1 (Fastner MeOH extractie) en 6 (vries/dooi met blender).

FIGUUR 2

MICROCYSTINE GEHALTEN NA 6 METHODEN VOOR CELETRACTIE VAN MONSTER A1 (UVA KWEEK: MICROCYSTIS, ANABAENA, PLANKTOTHRIX). 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE, 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER



Op 30 augustus 2005 werd een monster genomen van een cyanodominantie in het Alkmaardermeer. De globale soortensamenstelling van dit monster was een dominantie van *Microcystis*, *Anabaena* en *Aphanizomenon*. Daarnaast werden nog wat draadvormende cyanobacteriën waargenomen. Het microcystine gehalte van dit monster zat rond de waarschuwningsnorm van 10 µg/L. Opvallend is dat de Fastner MeOH extractie (methode 1) bij dit monster een minder goed rendement heeft dan enkele van de simpele methoden (Figuur 3).

TABEL 1: VERGELIJKING 6 EXTRACTIEMETHODEN VOOR CYANOTOXINE ANALYSE

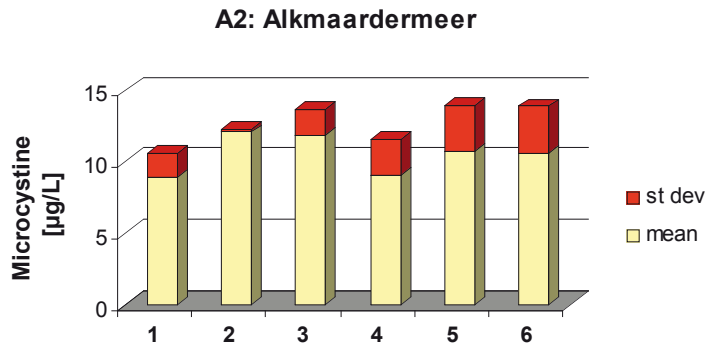
STOWA	serie A1 MC [$\mu\text{g/L}$]	serie A2 MC [$\mu\text{g/L}$]	serie A3 MC [$\mu\text{g/L}$]	serie A4 MC [$\mu\text{g/L}$]
1. Methanol extractie (Fastner methode)				
1.1	189	8,2	0,49	45
1.2	263	6,7	0,36	34
1.3	209	5,9	0,42	56
1.4	214	9,6	0,48	51
gemiddelde	219	7,6	0,44	47
extracellulair MC	16	1,3	0,06	1,0
totaal	235	9	0,50	48
sd	31	2	0,06	9
% sd	13%	18%	13%	20%
2. Ultrasoon probe				
2.1	227	12	0,08*	42
2.2	203	12	0,07*	37
2.3	185	-*	0,07*	33
2.4	218	-*	0,09*	32
gemiddelde	208	12	0,07	36
sd	18	0,2	0,01	4,7
% sd	9%	2%	12%	13%
3. Kokend waterbad				
3.1	216	10	0,15	52
3.2	224	11	0,22	55
3.3	235	14	0,25	51
3.4	263	13	0,21	58
gemiddelde	235	12	0,21	54
sd	21	2	0,04	3,2
% sd	9%	16%	20%	6%
4. Magnetron				
4.1	260	7	0,08	39
4.2	229	9	0,10	36
4.3	225	8	0,10	35
4.4	262	13	0,17	44
gemiddelde	244	9	0,11	38
sd	20	2	0,04	4,2
% sd	8%	27%	36%	11%
5. Vriezen/dooien & ultrasoon bad				
5.1	232	12	0,17	57
5.2	212	15	0,17	47
5.3	252	9	0,01	42
5.4	217	7	0,01	39
gemiddelde	228	11	0,09	46
sd	18	3	0,09	8,0
% sd	8%	31%	103%	17%
6. Vriezen/dooien & blender				
6.1	235	10	0,01	44
6.2	175	6	0,08	48
6.3	182	12	0,14	57
6.4	287	14	0,14	50
gemiddelde	220	11	0,09	50
sd	52	3	0,06	5,6
% sd	24%	31%	68%	11%

*: problemen met ultrasoon probe.

Het extracellulaire gehalte van dit monster was relatief hoog (17%). De ultrasoon probe en het kokend waterbad (methoden 2 en 3) gaven het hoogste rendement bij dit monster. Bij dit monster waren er problemen met de ultrasoon probe die bij de laatste 2 monsters niet op vol vermogen functioneerde. Deze monsters zijn niet meegenomen in de berekening voor het gemiddelde en de standaard deviatie (Tabel 1). De reproduceerbaarheid was het minst goed bij de magnetron extractie en de beide vries/dooi methoden (respectievelijk methoden 4, 5 en 6).

FIGUUR 3

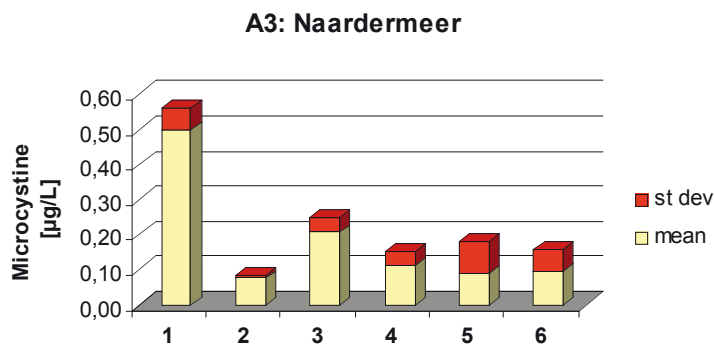
MICROCYSTINE GEHALTEN NA 6 METHODEN VOOR CELETRACTIE VAN MONSTER A2 (ALKMAARDERMEER: MICROCYSTIS, ANABAENA, APHANIZOMENON). 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE; 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER



Op 2 september 2005 werd er een monster genomen van het Naardermeer (geen zwemlocatie). De globale soortensamenstelling was een dominantie van de soorten Anabaena en Aphanizomenon. Het microcystine gehalte van dit monster was zeer laag (net boven de detectiegrens van 0.05 µg/L). Bij dit monster is het rendement van de Fastner MeOH extractie duidelijk beter dan dat van de simpele methoden (Figuur 4). De celeextractie met een kokend waterbad heeft het hoogste rendement van de alternatieve methoden. De ultrasoon probe functioneerde bij dit monster overigens nog steeds niet naar behoren. De beste reproduceerbaarheid werd gevonden voor de methoden 3 en 4 (respectievelijk kokend waterbad en magnetron).

FIGUUR 4

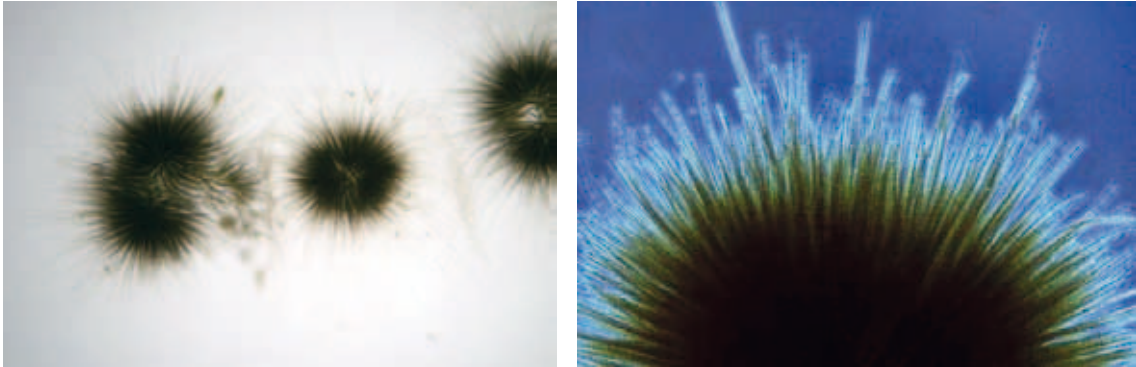
MICROCYSTINE GEHALTEN NA 6 METHODEN VOOR CELETRACTIE VAN MONSTER A3 (NAARDERMEER: ANABAENA, APHANIZOMENON). 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE; 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER



Op 14 september werden er een monsters genomen in de Vinkeveense plassen en de Vecht, die werden gecombineerd tot een mengmonster (verhouding 50:50). De globale soortensamenstelling van dit monster was een codominantie van Microcystis (Vecht) en Gloeotrichia (Vinkeveense plassen), met aantoonbare hoeveelheden Oscillatoria en Aphanocapsa. De Gloe-

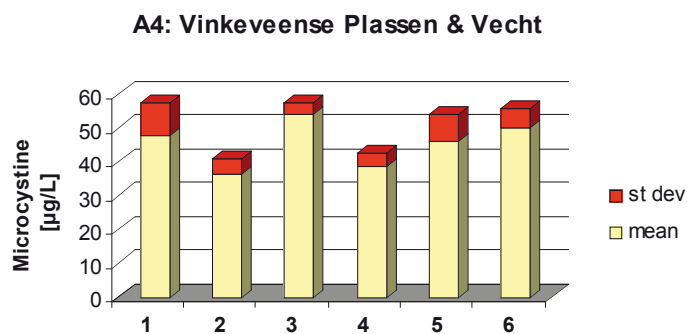
trichia dominantie in de Vinkeveense plassen was opvallend omdat deze soort zelden wordt gevonden in Nederland. Foto's van deze toxische cyanobacterie (beschikbaar gesteld door Edwin Kardinaal, UvA en Bas Ibelings, NIOO) zijn weergegeven in Figuur 5.

FIGUUR 5 MICROSCOPISCHE OPNAMEN VAN DE TOXISCHE CYANOBACTERIESOORT GLOEOTRICHIA, DIE IN SEPTEMBER 2005 IN DE VINKEVEENSE Plassen WERD AANGETROFFEN



Het hoogste extractie rendement werd voor dit monster gevonden na de celextractie in een kokend waterbad (Figuur 6) en de reproduceerbaarheid was het best voor de extractie met de ultrasoon probe, het kokend waterbad en de magnetron (methoden 2, 3 en 4).

FIGUUR 6 MICROCYSTINE GEHALTEN NA 6 METHODEN VOOR CELEXTRACTIE VAN MONSTER A4 (VINKEVEENSE Plassen & VECHT: MICROCYSTIS, GLOEOTRICHIA, OSCILLATORIA, APHANOCAPSA). 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE, 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER



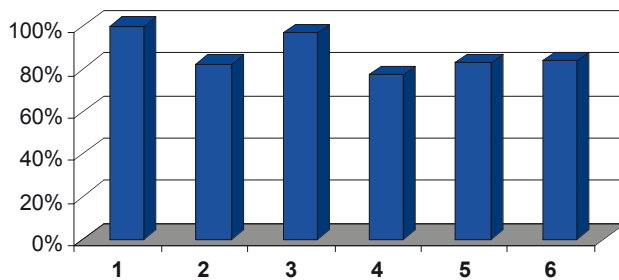
RENDEMENT VAN DE EXTRACTIEMETHODEN

In Figuur 7 is het gemiddelde rendement voor 4 monsters van de 5 snelle extractiemethoden ten opzichte van de meest betrouwbare methode 1 (Fastner MeOH extractie) weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat het gemiddelde rendement van de methode met een kokend waterbad het hoogst is. Alleen bij het monster uit het Naardermeer met een zeer laag microcystine gehalte was het rendement van deze extractie, net als dat van de overige simpele methoden, laag (Figuur 4). Het gemiddelde rendement van de overige snelle methoden was duidelijk lager dan dat van de extractie met een kokend waterbad. De resultaten van de monsters waarbij de ultrasoon probe niet goed werkte zijn niet meegenomen bij de berekening.

FIGUUR 7

GEMIDDELDE EXTRACTIE RENDEMENTEN VAN 4 MONSTERS NA CELEXTRACTIE MET 6 VERSCHILLENDE METHODEN. 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE, 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER

gemiddeld rendement t.o.v. Fastner methode



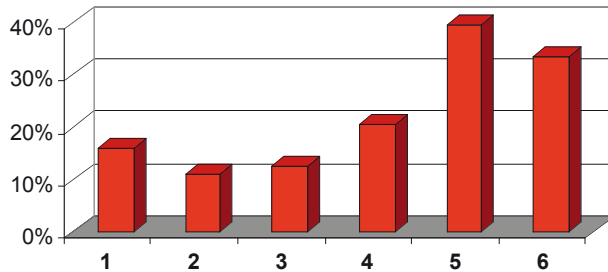
REPRODUCEERBAARHEID VAN DE EXTRACTIEMETHODEN

In Figuur 8 zijn de gemiddelde standaard deviaties voor 4 monsters van de 6 extractiemethoden weergegeven. De laagste spreiding (en dus de hoogste reproduceerbaarheid) werd waargenomen voor de methoden met de ultrasoon probe en het kokend waterbad. De reproduceerbaarheid van deze 2 snelle methoden was zelfs beter dan die van de Fastner methode. De resultaten van de monsters waarbij de ultrasoon probe niet goed werkte zijn niet meegenomen bij de berekening.

FIGUUR 8

GEMIDDELDE REPRODUCEERBAARHEID (% STANDAARD DEVIATIE) VAN 4 MONSTERS NA CELEXTRACTIE MET 6 VERSCHILLENDE METHODEN. 1: FASTNER MEOH EXTRACTIE, 2: ULTRASOON PROBE; 3: KOKEND WATERBAD; 4: MAGNETRON; 5: VRIES/DOOI MET ULTRASOONBAD; 6: VRIES/DOOI MET BLENDER

gemiddelde spreiding



CONCLUSIES EXPERIMENT A.

Op grond van de resultaten van experiment A kan worden geconcludeerd dat een van de meest simpele methoden voor de celextractie, 20 minuten in een kokend waterbad, de beste resultaten oplevert voor zowel het rendement als de reproduceerbaarheid van de extractie. Alleen in monster A3, waarin zeer lage cyanotoxine gehalten werden gevonden, waren de gehalten duidelijk lager dan met de Fastner MeOH extractie. Voor alle monsters was de spreiding van de methode met kokend waterbad bevredigend. Omdat de methode aan alle vooraf gestelde randvoorwaarden voldoet (betrouwbaar, snel en simpel) is deze methode geselecteerd om in experiment B verder te worden geoptimaliseerd.

4.2 EXPERIMENT B: OPTIMALISATIE VAN DE MEEST GESCHIKTE EXTRACTIEMETHODE

De optimalisatie van de methode die in experiment A is geselecteerd werd in twee stappen uitgevoerd. In eerste aanleg werd de optimale kooktijd voor de celextractie bepaald, waarbij geen verlies in microcystine gehalten mag optreden door afbraak bij de hoge temperatuur (onderdeel 5.2.1). Daarna werd bij de optimale kooktijd bestudeerd of toevoeging van methanol aan het monster binding van cyanotoxines aan plastics tegengaat, zodat het rendement van de extractie hoger wordt (onderdeel 5.2.2).

4.2.1 OPTIMALISATIE VAN DE KOOKTIJD VOOR HET RENDEMENT VAN DE CELEXTRACTIE

Op grond van eerdere ervaringen is besloten de kooktijd te variëren van 20 tot 60 minuten. Van een monster uit Vinkeveen (dorp) zijn 3 verdunningen gemaakt (10x, 100x en 1000x verdund). De globale soortensamenstelling van dit monster was een dominantie van *Microcystis* met de aanwezigheid van *Anabaena* en *Aphanizomenon*. De resultaten van deze proef zijn weergegeven in Tabel 2 en de gemiddelden met standaard deviaties zijn uitgezet in Figuren 9 t/m 12.

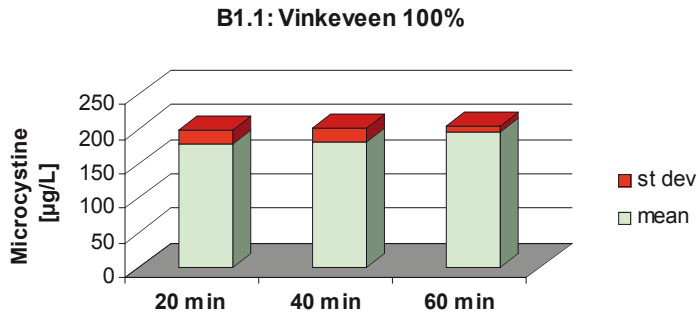
TABEL 2 OPTIMALISATIE KOOKTIJD VOOR RENDEMENT CELEXTRACTIE

Vinkeveen:	B1.1: 100%	B1.2: 10%	B1.3: 1%	B1.4: 0.1%
	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
20 minuten				
1	178	22	3,2	0,29
2	152	26	3,3	0,28
3	187	17	2,9	0,16
4	198	15	2,4	0,16
gemiddelde	179	20	2,9	0,22
sd	20	5	0,4	0,08
% sd	11%	23%	13%	34%
40 minuten				
1	189	24	1,7	0,19
2	204	25	2,4	0,26
3	153	15	1,7	0,36
4	176	17	1,6	0,23
gemiddelde	180	20	1,9	0,26
sd	22	5	0,38	0,07
% sd	12%	25%	20%	28%
60 minuten				
1	197	23	2,3	0,25
2	202	26	1,5	0,18
3	198	21	2,2	0,07
4	183	19	2,5	0,09
gemiddelde	195	22	2,1	0,15
sd	8	3	0,4	0,08
% sd	4%	14%	21%	57%

Bij het monster dat onverdund in behandeling is genomen (B1.1) zijn weinig invloeden van de kooktijd zichtbaar (Figuur 9). Na 60 minuten koken werd een iets hoger rendement en een iets betere reproduceerbaarheid gevonden.

FIGUUR 9

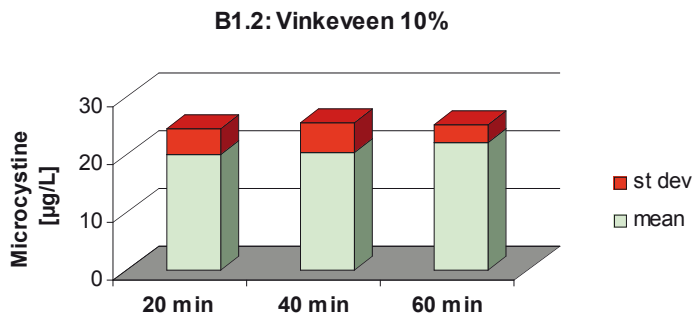
MICROCYSTINE GEHALTEN NA 3 TIJDEN VAN CELEXTRACTIE IN KOKEND WATERBAD MET EEN MONSTER VAN VINKEVEEN (ONVERDUND)



Ook bij het 10x verdunde monster van Vinkeveen (B1.2) zijn weinig invloeden van de kooktijd zichtbaar (Figuur 10). Ook hier werd na 60 minuten koken een iets hoger rendement en een iets betere reproduceerbaarheid gevonden. De microcystine gehalten bij deze verdunning liggen in het concentratiegebied waarbij zwemverboden of waarschuwingen worden afgegeven (10-20 µg/L).

FIGUUR 10

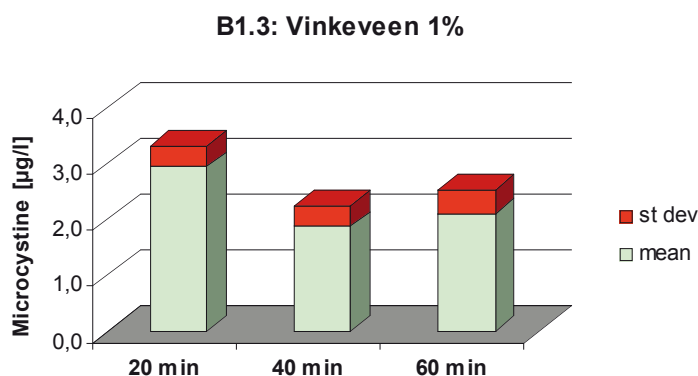
MICROCYSTINE GEHALTEN NA 3 TIJDEN VAN CELEXTRACTIE IN KOKEND WATERBAD MET EEN MONSTER VAN VINKEVEEN (10X VERDUND)



Bij het 100x verdunde monster van Vinkeveen (B1.3) is een ander beeld zichtbaar (Figuur 11), waarbij de kortste kooktijd het hoogste rendement geeft. De reproduceerbaarheid is gelijk bij de drie kooktijden.

FIGUUR 11

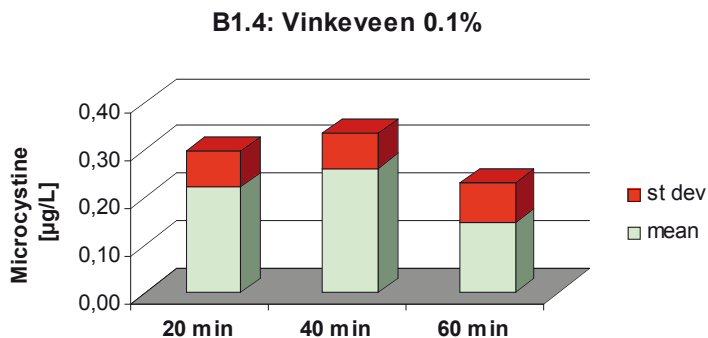
MICROCYSTINE GEHALTEN NA 3 TIJDEN VAN CELEXTRACTIE IN KOKEND WATERBAD MET EEN MONSTER VAN VINKEVEEN (100X VERDUND)



De resultaten van het 1000x verdunde monster van Vinkeveen (B1.4) laten een hoogste rendement zien bij 40 minuten kooktijd (Figuur 12). De reproduceerbaarheid in het minst goed na 60 minuten koken.

FIGUUR 12

MICROCYSTINE GEHALTEN NA 3 TIJDEN VAN CELETRACTIE IN KOKEND WATERBAD MET EEN MONSTER VAN VINKEVEEN (1000X VERDUND)

**CONCLUSIES EXPERIMENT B1**

De resultaten voor wat betreft een variatie van de kooktijd zijn niet eenduidig. Bij hoge concentraties microcystine lijkt een lange kooktijd van 60 minuten iets gunstiger voor het rendement en de reproduceerbaarheid. Bij lagere concentraties wordt na 60 minuten echter een lager rendement en reproduceerbaarheid waargenomen. Bij de concentratie die bepalend is voor zwemverboden en waarschuwingen is de invloed van de kooktijd te verwaarlozen (Figuur 10). Omdat het hanteren van verschillende kooktijden voor verschillende concentraties cyanobacteriën niet de voorkeur heeft wordt een kooktijd van 20 minuten geadviseerd, omdat na een langere kooktijd geen sterke verbeteringen van rendement en reproduceerbaarheid optreden en geen afbraak van microcystines lijkt op te treden. In een vervolgstudie kan worden onderzocht of een nog kortere kooktijd mogelijk is.

4.2.2 DE INVLOED VAN METHANOL TOEVOEGING OP HET RENDEMENT VAN DE EXTRACTIE

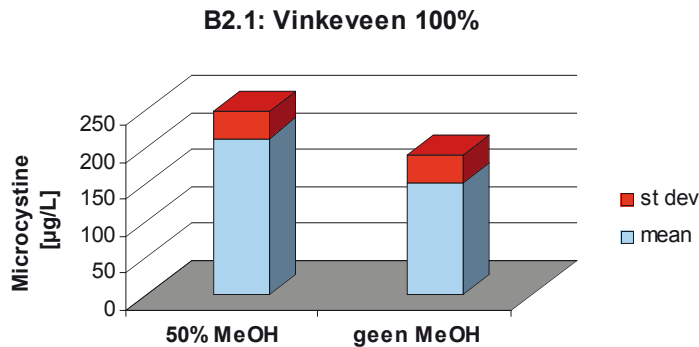
In dit onderdeel wordt onderzocht in hoeverre methanol toevoeging de binding van microcystines aan plastic laboratoriumbenodigdheden kan tegengaan. De proef is uitgevoerd met 3 verdunningen van het monster uit Vinkeveen, dat ook voor onderdeel 5.2.1 is gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 1 en de gemiddelden met standaarddeviatie zijn uitgezet in de Figuren 13 t/m 15.

TABEL 3 INVLOED MEOH TOEVOEGING OP EXTRACTIE RENDEMENT

Vinkeveen:	B2.1: 100% MC [µg/L]	B2.2: 10% MC [µg/L]	B2.3: 1% MC [µg/L]
50% methanol			
1	177	26	3,1
2	190	31	3,4
3	228	34	3,9
4	254	31	3,9
gemiddelde	212	31	3,6
sd	35	3	0,4
% sd	17%	10%	10%
zonder methanol			
1	203	28	2,9
2	154	17	3,3
3	120	22	3,8
4	135	21	4,7
gemiddelde	153	22	3,7
sd	36	5	0,8
% sd	24%	21%	21%

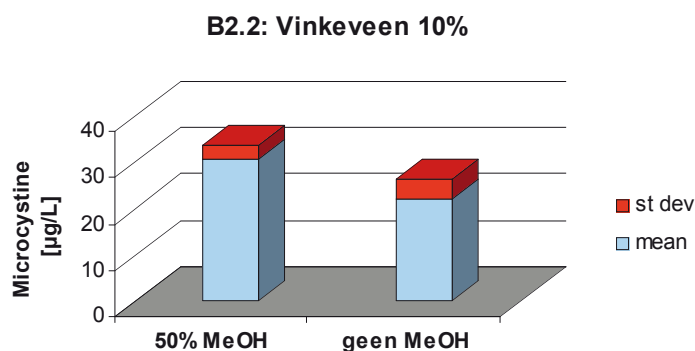
Toevoeging van een gelijk volume methanol aan het onverdunde monster uit Vinkeveen (B2.1) blijkt een positief effect op het rendement te hebben (Figuur 13). Het microcystine gehalte is ongeveer 40% hoger dan bij toevoeging van demiwater, terwijl de reproduceerbaarheid relatief beter is (Tabel 3).

FIGUUR 13 MICROCYSTINE GEHALTEN IN EEN MONSTER UIT VINKEVEEN (ONVERDUND) NA CELEXTRACTIE (30 MINUTEN IN KOKEND WATERBAD) EN EXTRACTIE MET EN ZONDER TOEVOEGING VAN METHANOL



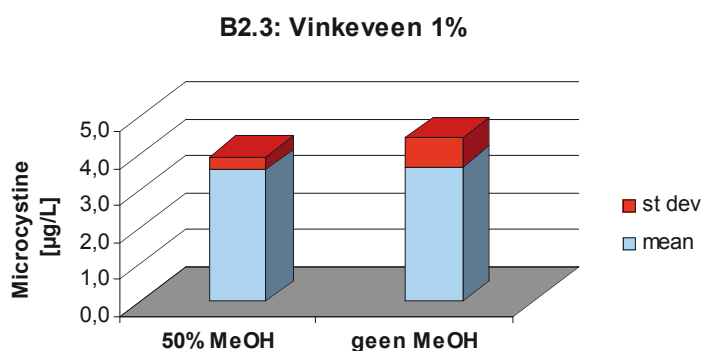
Bij een 10x verdund monster uit Vinkeveen wordt eveneens een verbetering van het rendement en de reproduceerbaarheid van de extractie waargenomen na toevoeging methanol aan het monster (Figuur 14). De reproduceerbaarheid is zowel relatief als absoluut verbeterd na de MeOH toevoeging.

FIGUUR 14 MICROCYSTINE GEHALTEN IN EEN MONSTER UIT VINKEVEEN (10X VERDUND) NA CELEXTRACTIE (30 MINUTEN IN KOKEND WATERBAD) EN EXTRACTIE MET EN ZONDER TOEVOEGING VAN METHANOL



Bij toevoeging van methanol aan het 100x verdunde monster wordt geen verbetering van het rendement van de extractie waargenomen (Figuur 15). De reproduceerbaarheid van de extractie is echter een stuk beter na de MeOH toevoeging.

FIGUUR 15 MICROCYSTINE GEHALTEN IN EEN MONSTER UIT VINKEVEEN (100X VERDUND) NA CELEXTRACTIE (30 MINUTEN IN KOKEND WATERBAD) EN EXTRACTIE MET EN ZONDER TOEVOEGING VAN METHANOL



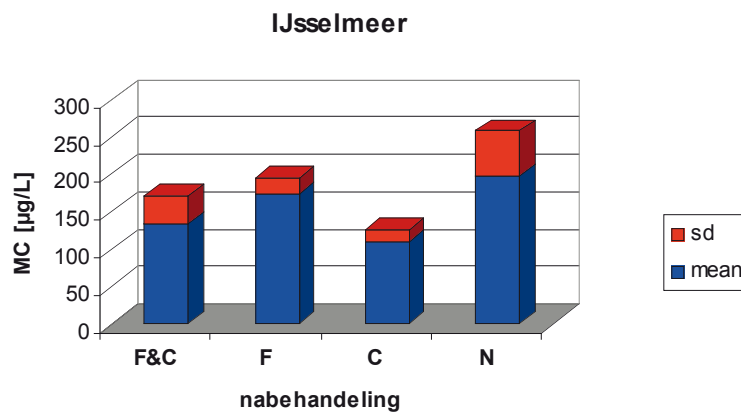
CONCLUSIES EXPERIMENT B2

Toevoeging van 50% methanol aan het monster heeft bij alle monsters een positief effect op de reproduceerbaarheid van de extractie. Bij de meeste monsters wordt een verhoogd rendement van de extractie gevonden. De methanoltoevoeging wordt aanbevolen als onderdeel van de procedure.

4.2.3 INVLOED VAN NABEHANDELINGEN VAN HET EXTRACT OP HET EXTRACTIERENDEMENT

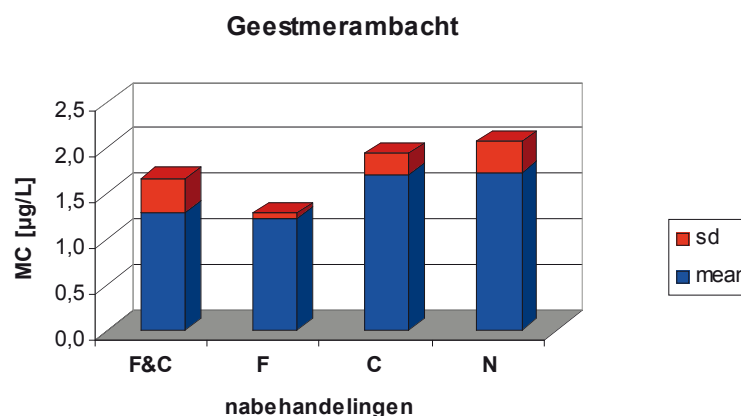
De resultaten van de microcystine analyses van experiment B3, het bepalen van de noodzaak van nabehandelingen van de extractie, zijn weergegeven in Tabel 4 en de gemiddelden met standaard deviatie zijn uitgezet in Figuren 16 en 17.

FIGUUR 16 MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN HET IJSSELMEER (MICROCYSTIS) BIJ VERSCHILLENDE NABEHANDELINGEN VAN HET GEËXTRAHEERDE MONSTER



In een monster van het IJsselmeer met hoge concentratie Microcystis is te zien dat centrifugeren het rendement van de extractie verlaagt en dat het hoogste rendement wordt gevonden bij geen nabehandeling. De laagste spreidingen worden gevonden bij alleen filtratie of centrifugatie.

FIGUUR 17 MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN HET GEESTMERAMBACHT (ANABAENA EN MICROCYSTIS) BIJ VERSCHILLENDE NABEHANDELINGEN VAN HET GEËXTRAHEERDE MONSTER; CODES NABEHANDELINGEN: ZIE TABEL 4)



In een monster uit de recreatieplas van Geestmerambacht met lage concentratie Microcystis en Anabaena is te zien dat filtreren het rendement verlaagt en dat ook hier het hoogste rendement wordt gevonden bij geen nabehandeling. De laagste spreidingen worden gevonden bij alleen filtratie.

TABEL 4

ANALYSE NOODZAAK VAN FILTRATIE EN CENTRIFUGATIE NABEHANDELING BIJ MICROCYSTINE EXTRACTIE

	IJsselmeer	Geestmerambacht
centrifugatie en filtratie (C&F)	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
T1	176	1,0
T2	118	1,7
T3	111	1,2
gemiddelde	135	1,3
sd	36	0,4
alleen filtratie (F)	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
F1	194	1,2
F2	152	1,3
F3	176	1,2
gemiddelde	174	1,2
sd	21	0,1
alleen centrifugatie (C)	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
C1	101	2,0
C2	101	1,5
C3	128	1,7
gemiddelde	110	1,7
sd	16	0,2
geen voorbehandeling (N)	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
N1	136	2,0
N2	205	1,8
N3	254	1,4
gemiddelde	198	1,7
sd	59	0,3

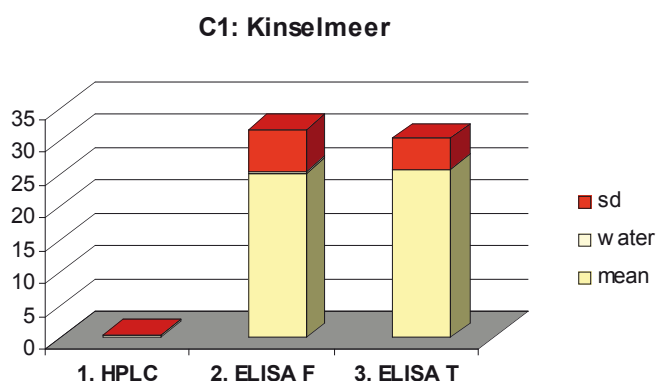
CONCLUSIES EXPERIMENT B3

Uit deze metingen kan worden geconcludeerd dat zowel filtreren als centrifugeren geen positief effect hebben op het extractierendement. Deze behandelingen kunnen dus achterwege worden gelaten, tenzij het geëxtraheerde monster zo veel celmateriaal bevat dat het niet meer nauwkeurig gepipetteerd kan worden. Om de spreiding in het extractierendement te beperken is het belangrijk om het onbehandelde extract goed te homogeniseren (bijvoorbeeld 3 maal 10 seconden op een Vortex mixer).

4.3 EXPERIMENT C: VERGELIJKING EXTRACTIEMETHODE VOOR ELISA EN HPLC ANALYSE

De snelle opwerkingsmethode zal bij voorkeur geschikt moeten zijn voor zowel ELISA als HPLC analyse. In experiment C van dit project is onderzocht of de methode bruikbaar is voor de beide analyses. Omdat de HPLC methode minder gevoelig is dan de ELISA moet een concentratiestap door filtratie van het monster worden uitgevoerd. Aangezien alleen cellen op het filter achterblijven wordt met deze methode het intracellulaire microcystine bepaald. Om het totaal microcystine te bepalen is ook het extracellulaire microcystine is voor elk monster gemeten door het gefilterde water met ELISA te analyseren. Ter controle is de ELISA analyse zowel op het filter als op het totale monster uitgevoerd. De resultaten van deze analyses zijn weergegeven in de figuren 18 t/m 21 en in Tabel 5.

FIGUUR 18 MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN HET KINSELMEER (MICROCYSTIS EN PLANKTOHTRIX) NA VERSCHILLENDE ANALYSE METHODEN:
1. HPLC ANALYSE VAN FILTER (10 ML MONSTER); 2. ELISA ANALYSE VAN FILTER (10 ML MONSTER); 3. ELISA ANALYSE TOTAAL MONSTER



In het monster van het Kinselmeer werd met ELISA analyse een hoeveelheid microcystine aangetoond die boven de 20 µg/L norm voor een zwemverbod ligt (Figuur 18). In dit geval lijkt de extractiemethode voor het filter goed te werken, omdat de ELISA analyse van het filterextract een vergelijkbaar resultaat opleverde als de ELISA analyse van het totale monster. Het extracellulaire microcystine was slechts 1% van het totaal microcystine in dit monster. De RR- en LR-microcystine gehalten van het filterextract lagen echter onder de detectiegrenzen van de HPLC methode.

TABEL 5 VERGELIJKING KOKEND WATER EXTRACTIEMETHODE VOOR ELISA EN HPLC ANALYSE

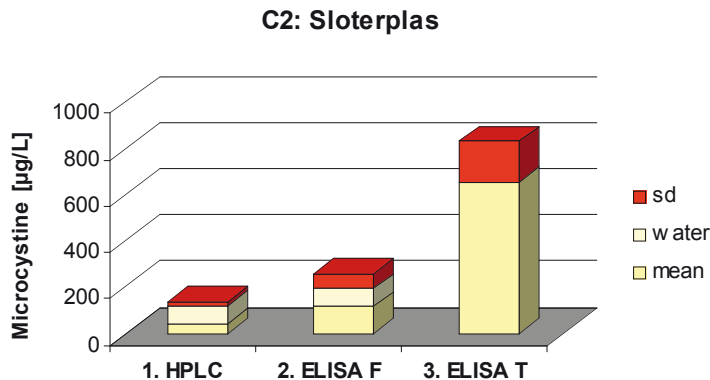
monstercode	C1	C2	C3	C4
	MC [µg/L]	MC [µg/L]	MC [µg/L]	MC [µg/L]
1. Filtratie en HPLC analyse				
1	nd*	40	nd	46
2	nd	51	nd	32
3	nd	41	nd	47
4	nd	37	nd	57
gemiddelde	nd	42	nd	45
extracellulair MC**	0,24	78	26	29
totaal	0.24	120	26	74
sd	0	6	0	10
% sd	0%	15%	0%	23%
2. Filtratie en ELISA analyse				
5	29	104	1,8	201
6	21	111	1,4	205
7	19	85	1,7	243
8	32	172	3,0	265
gemiddelde	25	118	1,98	229
extracellulair MC**	0,24	78	26	29
totaal	25	196	28	258
sd	6	37,5	0,67	30,7
% sd	25%	32%	34%	13%
3. Directe ELISA analyse				
9	23	495	25	333
10	23	802	24	318
11	33	817	26	540
12	24	514	31	651
gemiddelde	26	657	26	461
sd	5	176	6	162,4
% sd	18%	27%	24%	35%

*: nd = onder detectiegrenzen;

** : extracellulair microcystine in water bepaald met ELISA analyse

FIGUUR 19

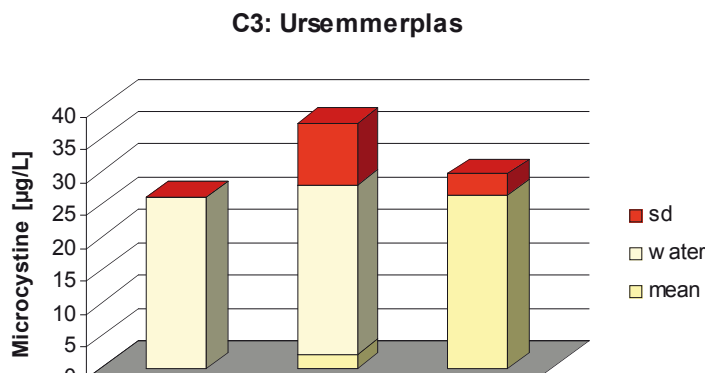
MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN DE SLOTERPLAS (MICROCYSTIS DOMINANTIE) NA VERSCHILLENDE ANALYSE METHODEN: 1. HPLC ANALYSE VAN FILTER (5 ML MONSTER); 2. ELISA ANALYSE VAN FILTER (5 ML MONSTER); 3. ELISA ANALYSE TOTAAL MONSTER; LICHTGELE BALK IS EXTRACELLULAIR MICROCYSTINE (ELISA ANALYSE)



In het monster van de Sloterplas werd met de directe ELISA analyse een zeer hoog microcystine gehalte waargenomen (Figuur 19). Bij deze hoge gehalten blijkt de extractiemethode niet geschikt voor het filter, want het gehalte dat met ELISA in het filterextract werd gemeten was duidelijk lager dan het gehalte van de directe ELISA. De som van de RR- en LR microcystine gehalten die met HPLC werd gemeten in het filterextract was lager dan het gehalte dat met ELISA werd bepaald. Het extracellulaire microcystine gehalte in dit monster was 12% van het totaal van de directe ELISA.

FIGUUR 20

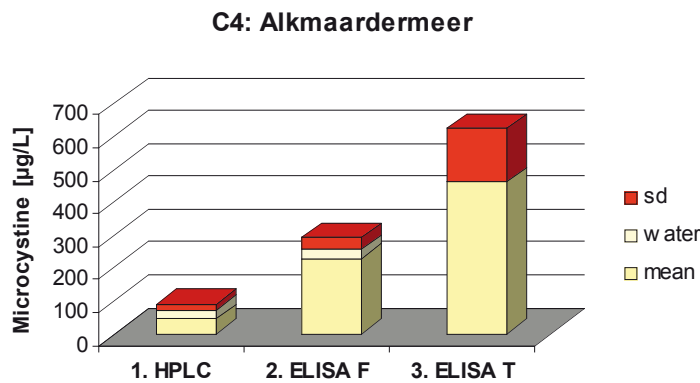
MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN DE URSEMMERPLAS (ANABAENA EN MICROCYSTIS) NA VERSCHILLENDE ANALYSE METHODEN: 1. HPLC ANALYSE VAN FILTER (20 ML MONSTER); 2. ELISA ANALYSE VAN FILTER (20 ML MONSTER); 3. ELISA ANALYSE TOTAAL MONSTER; LICHTGELE BALK IS EXTRACELLULAIR MICROCYSTINE (ELISA ANALYSE)



Het monster van de Ursemmerplas bevatte een relatief zeer hoog gehalte aan extracellulair microcystine dat ruim 95% van het totaal gehalte uitmaakte. Het is dus begrijpelijk dat de met ELISA bepaalde gehalten in het filterextract veel lager waren dan het gehalte van het totaal geëxtraheerde monster. De som van de intra- en extracellulaire gehalten waren vergelijkbaar met het gehalte van de directe ELISA. De gehalten in het filterextract waren te laag om met HPLC te kunnen meten.

FIGUUR 21

MICROCYSTINE GEHALTEN VAN EEN MONSTER VAN HET ALKMAARDERMEER (ANABAENA EN MICROCYSTIS) NA VERSCHILLENDE ANALYSE METHODEN: 1. HPLC ANALYSE VAN FILTER (5 ML MONSTER); 2. ELISA ANALYSE VAN FILTER (5 ML MONSTER); 3. ELISA ANALYSE TOTAAL MONSTER; LICHTGELE BALK IS EXTRACELLULAIR MICROCYSTINE (ELISA ANALYSE).



Het beeld bij het monster van de Alkmaarderplas is vergelijkbaar als dat van de Sloterplas. Ook hier werd met de directe ELISA analyse een zeer hoog microcystine gehalte waargenomen en was het gehalte dat met ELISA in het filterextract werd gemeten was duidelijk lager. In dit monster werd met HPLC geen RR-microcystine aangetoond. Het LR-microcystine gehalte dat werd gemeten in het filterextract was duidelijk lager dan het gehalte dat met ELISA werd bepaald. Het extracellulaire microcystine gehalte in dit monster was 11% van het totaal van de directe ELISA.

CONCLUSIES EXPERIMENT C

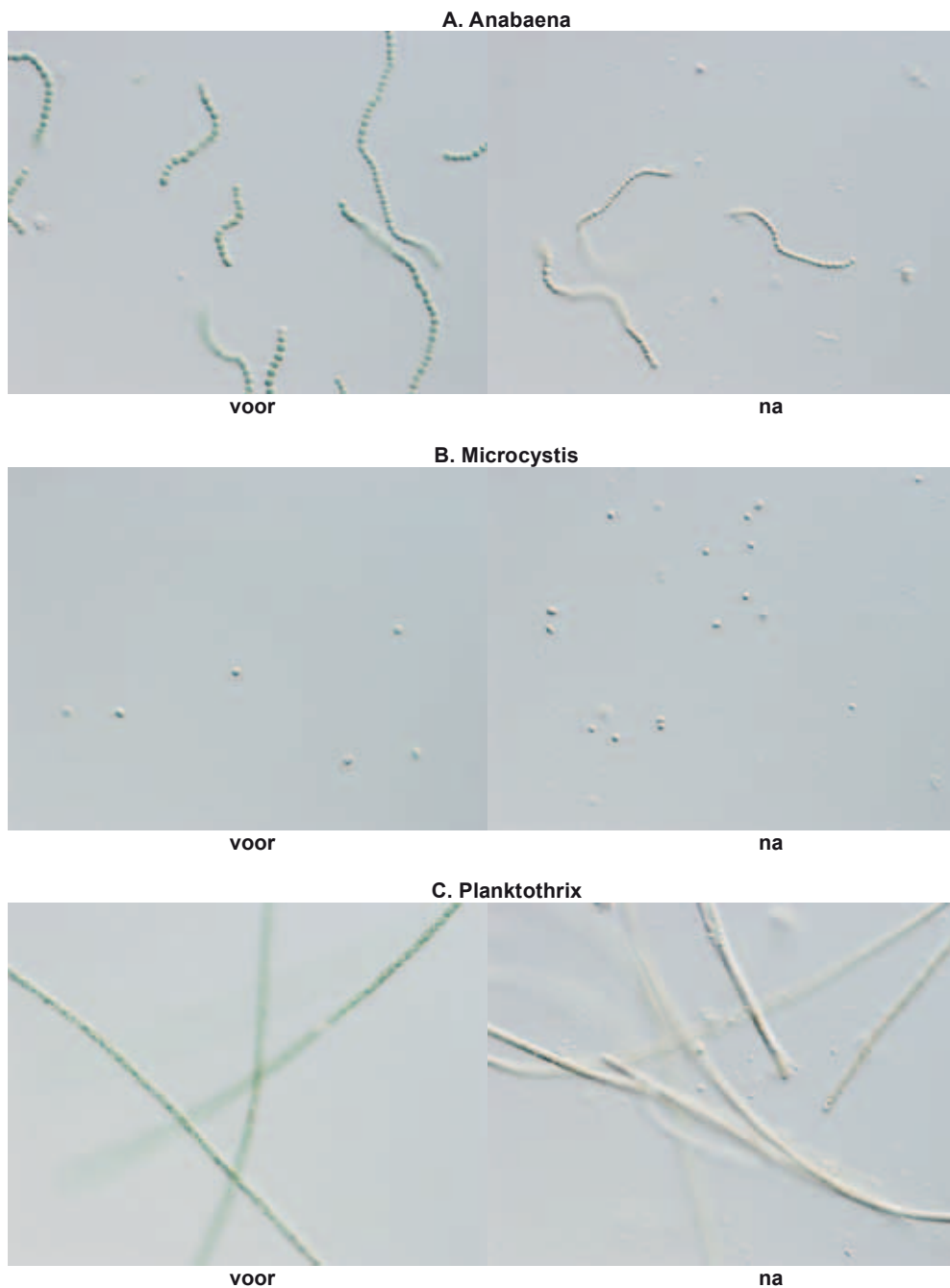
In het algemeen kan worden gesteld dat de extractie waarbij de filters 30 minuten in een 50% methanol oplossing in kokend water worden verhit ongeschikt is voor de extractie van intracellulair microcystine, vooral voor monsters met hoge gehalten cyanobacteriën (drijflagen). Bij deze monsters lijkt de extractie met kokend water niet robuust genoeg om het microcystine volledig van de filters af te krijgen. De met HPLC bepaalde MC gehalten waren in alle gevallen lager dan de met ELISA bepaalde gehalten.

4.4 KWALITEITSCONTROLE EXTRACTIEMETHODE

4.4.1 MICROSCOPISCH ONDERZOEK

Het microscopische onderzoek van de extractie met drie soorten cyanobacteriën (Anabaena, Microcystis en Planktothrix) is uitgevoerd door Annie Kreike (Waterproef/Hollands Noorderkwartier). De foto's zijn weergegeven in figuur 22. Het was opvallend dat er bij de Microcystis kweek alleen losse cellen zichtbaar waren en dat er geen kolonievorming optrad die in het veld wordt waargenomen.

FIGUUR 22: MICROSCOPISCH ONDERZOEK VAN DRIE SOORTEN CYANOBACTERIËN, A. ANABAENA, B. MICROCYSTIS EN C. PLANKTOTHRIX) VOOR EN NA DE EXTRACTIE MET 50% METHANOL IN KOKEND WATER. VERGROTING 400X. FOTO'S: ANNIE KREIKE, WATERPROEF.



Uit het microscopische onderzoek bleek dat de cellen van alle drie de soorten cyanobacteriën niet kapot gingen door de behandeling van 30 minuten in kokend water omdat de aantallen hele cellen in de monsters voor en na de behandeling ongeveer gelijk waren. Bij *Microcystis* en *Anabaena* was er echter wel een duidelijke verkleining van de gemiddelde celdiameter waar te nemen (zie Tabel 3). Hieruit blijkt dat bij deze soorten een deel van de celinhoud werd uitgescheiden tijdens de extractie. De celdiameter van *Planktothrix* werd niet beïnvloed door de extractie. Het verdwijnen van chlorofyl uit de cellen (op de foto's zichtbaar als het verdwijnen van de groene kleur) zal waarschijnlijk een gevolg zijn van de extractie met methanol.

TABEL 6 MICROCYSTINE GEHALTEN EN CELDIAMETERS CYANOBACTERIËN VOOR EN NA EXTRACTIE

	microcystine [$\mu\text{g/L}$]		celdiameters [μm]			
	voor extractie	na extractie	voor extractie		na extractie	
			gemiddelde	sd	gemiddelde	sd
Anabaena	0,8	0,8	3,51	0,46	2,52	0,41
Microcystis	1,4	284	3,65	0,27	3,10	0,28
Planktothrix	304	333	4,21	0,45	4,17	0,37

Uit de microcystine gehalten in Tabel 3 blijkt dat de extractie geen effect heeft bij *Anabaena*, maar dat er bij *Microcystis* een grote hoeveelheid microcystine vrijkomt als gevolg van de behandeling met methanol in kokend waterbad. Bij *Planktothrix* werd geen effect van de extractie op de celdiameter gevonden, maar het microcystine gehalte van dit monster blijkt ook zonder voorbehandeling al goed meetbaar te zijn (Tabel 3). Het is onbekend of er altijd een hoog extracellulair gehalte in de kweek aanwezig is en of de celwand van *Planktothrix* permeabel is voor microcystine.

CONCLUSIES MICROSCOPISCH ONDERZOEK

Hoewel de cellen van de onderzochte cyanobacteriën soorten door de extractiemethode niet kapot gekookt worden, is de in dit onderzoek voorgestelde extractie wel geschikt om microcystines te isoleren uit *Microcystis*. Mede op grond van de resultaten uit experiment A lijkt de methode ook geschikt voor *Planktothrix*, maar een nader onderzoek met veldmonsters (zie 5.4.2) zal hierover uitsluitsel geven. De methode is niet geschikt om microcystines uit *Anabaena* te extraheren.

4.4.2 AANVULLEND ONDERZOEK OP VELDLOCATIES MET PLANKTOTHRIX DOMINANTIE

Om te onderzoeken of de extractiemethode met een kokend waterbad ook geschikt is voor *Planktothrix* zijn twee monsters van verschillende plekken in het Kinselmeer onderzocht. Uit microscopisch onderzoek bleek dat in de beide monsters naar schatting 1,2 miljoen cellen *Planktothrix* agardhii per liter aanwezig waren. De verhoogde microcystine gehalten die bij de *Planktothrix* kweek van de UvA werden waargenomen zonder dat het monster gekookt was (Tabel 6) blijken ook in het veld te worden waargenomen. Microcystine was al duidelijk meetbaar na de toevoeging van 50% methanol, ook zonder koken. Door het koken van het monster werd het extractierendement slechts licht verhoogd (Tabel 7 en Figuur 23).

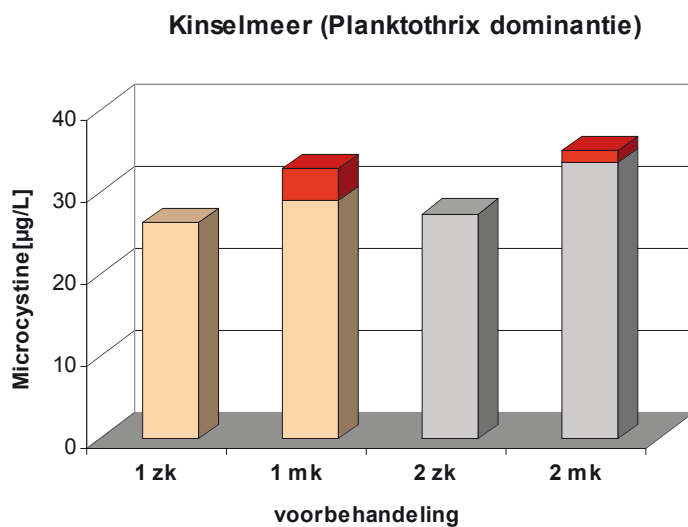
TABEL 7

MICROCYSTINE GEHALTEN VAN 2 KINSELMEER MONSTERS MET PLANKTOTHRIX DOMINANTIE, ZONDER (ZK) EN MET KOKEN (MK) VAN HET EXTRACT

	Kinselmeer 1 µg/L	Kinselmeer 2 µg/L
zk	26,2	27,3
mk 1	32,1	37,3
mk 2	32,5	35,4
mk 3	24,5	33,6
mk 4	26,8	34,6
gemiddelde mk	28,8	33,4
standaard deviatie mk	3,9	1,6

FIGUUR 23

MICROCYSTINE GEHALTEN VAN TWEE MONSTERS VAN HET KINSELMEER MET EEN PLANKTOTHRIX AGARDHII DOMINANTIE, NA EXTRACTIES ZONDER KOKEN (ZK) EN MET KOKEN (MK) IN EEN WATERBAD



CONCLUSIES AANVULLEND ONDERZOEK PLANKTOTHRIX

De in dit rapport voorgestelde extractiemethode lijkt bruikbaar voor monsters met Planktothrix dominantie, hoewel het koken in dit geval weinig toegevoegde waarde heeft.

4.4.3 RINGTEST MICROCYSTINE ANALYSE IN CYANOBACTERIËN

De gemiddelde waarden van de 4 monsters die voor de ringtest 2006 naar 8 laboratoria werden verstuurd voor microcystine analyse zijn weergegeven in Tabel 8 en in de figuren 24 t/m 27. Deze monsters zijn geëxtraheerd met de in dit onderzoek ontwikkelde extractiemethode (bijlage 2).

TABEL 8

GEMIDDELDE RESULTATEN STANDAARD EXTRACTIE MICROCYSTINE RINGTEST 2006

	Monster A	Monster B	Monster C	Monster D
	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]	MC [$\mu\text{g/L}$]
lab 1	1080	1220	3,2	0,72
lab 2	997	2187	6,4	4,70
lab 3	1006	381	3,7	1,40
lab 4	1080	1118	4,3	2,03
lab 5	1586	2540	4,5	0,44
lab 6	1035	1280	3,9	1,30
lab 7	1063	1327	2,4	1,23
lab 8	1832	905	8,0	1,62
mean	1210	1370	4,6	1,68
sd	317	689	1,8	1,32
% sd	26%	50%	40%	78%

De resultaten van de individuele waarnemingen van de voor de ringtest 2006 gemeten microcystine gehalten zijn weergegeven in Tabel 9. Extractie A is de extractie procedure die in dit onderzoek is ontwikkeld. Indien op de laboratoria afwijkende protocollen werden gehanteerd werden de monsters ter vergelijking ook met deze extractieprocedure (extractie B, tabel 9) geanalyseerd.

TABEL 9 RESULTATEN MICROCYSTINE RINGTEST 2006

LAB	Monster A		Monster B		Monster C		Monster D	
	MC [$\mu\text{g/L}$]		MC [$\mu\text{g/L}$]		MC [$\mu\text{g/L}$]		MC [$\mu\text{g/L}$]	
	extractie A	extractie B	extractie A	extractie B	extractie A	extractie B	extractie A	extractie B
1	1157		1666		3,0		0,74	
	1061		1168		3,5		0,73	
	1078		1041		2,3		0,72	
	1022		1005		3,9		0,68	
2	997	1562	2187	1100	6,4	4,9	4,7*	0,73
3	*	1006	*	381	*	3,7	*	1,4
4	924	773	1318	1366	4,2	4,2	1,8	2,0
	896	1119	1096	1647	4,5	5,5	1,9	2,1
	1419		941		4,2	7,1	2,4	2,3
5	1586	2232	2540	2819	4,5	5,8	0,44	0,75
6	1020		1290		3,6		1,3	
	1050		1270		4,2		1,3	
7	900		950		2,1		0,9	
	1170		1410		2,5		1,5	
	1120		1620		2,6		1,3	
8	3460	3440	1440	800	5	5,3	<0,85	<0,85
	204	344	370	5040	11	11	1,6	1,6
mean	1181	1497	1276	1879	4,2	5,9	1,46	1,56
sd	650	1045	545	1592	2,1	2,3	1,01	0,64
% sd	55%	70%	43%	85%	49%	39%	69%	41%
max	3460	3440	2540	5040	11	11	4,7	2,3
min	204	344	370	381	2,1	3,7	0,44	0,73

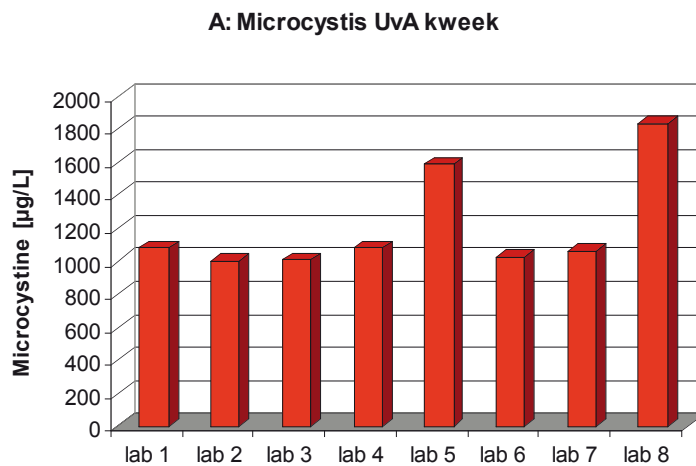
*: door dit lab is alleen een licht afwijkende extractieprocedure uitgevoerd

*: in rood vermeldde waarden verschillen meer dan 2 maal de standaard deviatie van het gemiddelde en kunnen als uitbijters worden beschouwd.

De maximaal en minimaal waargenomen microcystine gehalten zijn per extractie in respectievelijk gele en oranje vakken in de tabel aangegeven. Met uitzondering van enkele extreme waarden (met name bij laboratorium 8) komen de microcystine gehalten van de deelnemende laboratoria redelijk met elkaar overeen.

FIGUUR 24

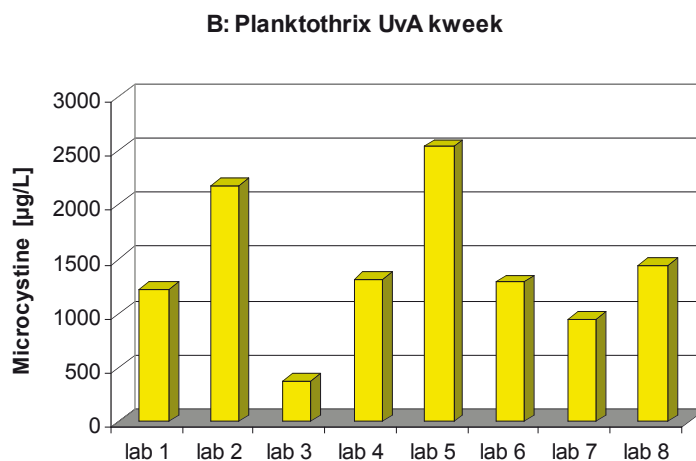
RESULTATEN VAN DE MICROCYSTINE ANALYSE VAN MONSTER A, MICROCYSTIS GEKWEEST OP DE UVA,
DOOR ACHT DEELNEMENDE LABORATORIA AAN DE RINGTEST 2006



De resultaten van de extractie en analyse van het Microcystine monster uit de UvA kweek kwamen zeer goed overeen tussen de verschillende laboratoria (Figuur 24). Alleen lab 5 (eigen microcystine standaard) en lab 8 wijken wat meer af van het gemiddelde van 1210 µg/L.

FIGUUR 25

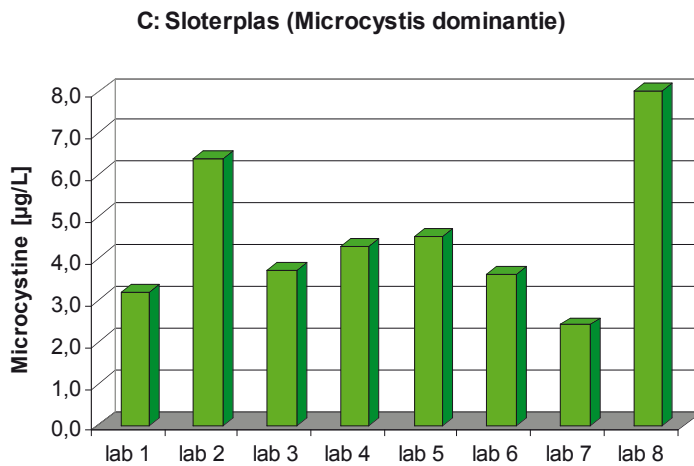
RESULTATEN VAN DE MICROCYSTINE ANALYSE VAN MONSTER B, PLANKTOTHRIX GEKWEEST OP DE UVA,
DOOR ACHT DEELNEMENDE LABORATORIA AAN DE RINGTEST 2006



De resultaten van de extractie en analyse van het Planktothrix monster uit de UvA kweek kwamen minder goed overeen tussen de verschillende laboratoria (Figuur 25). De resultaten van labs 2 en 5 zijn veel hoger en dat van lab 3 is veel lager dan het gemiddeld gemeten gehalte van 1370 µg/L. Blijkbaar is de extractie van Planktothrix lastiger te reproduceren dan die van Microcystis.

FIGUUR 26

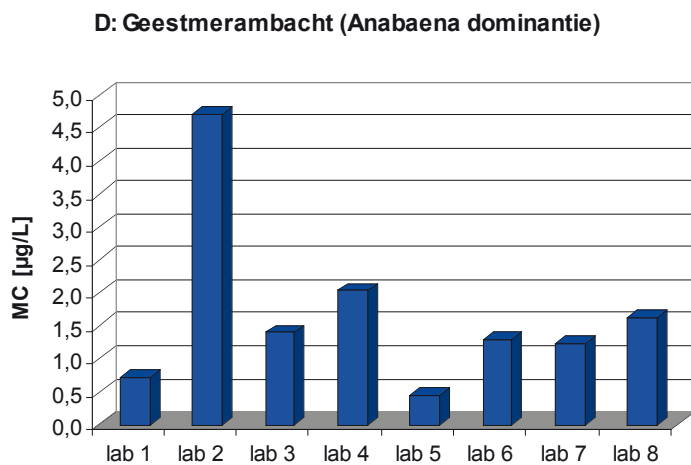
RESULTATEN VAN DE MICROCYSTINE ANALYSE VAN MONSTER C, SLOTERPLAS MET MICROCYSTIS DOMINANTIE, DOOR ACHT DEELNEMENDE LABORATORIA AAN DE RINGTEST 2006.



De resultaten van de extractie en analyse van het Sloterplas monster met Microcystis als dominante soort kwamen redelijk goed overeen tussen de verschillende laboratoria (Figuur 26). De resultaten van labs 2 en 8 zijn hoger en dat van lab 7 is wat lager dan het gemiddeld gemeten gehalte van $4.6 \mu\text{g/L}$.

FIGUUR 27

RESULTATEN VAN DE MICROCYSTINE ANALYSE VAN MONSTER D, GEESTMERAMBACHT RECREATIEPLAS MET ANABAENA DOMINANTIE, DOOR ACHT DEELNEMENDE LABORATORIA AAN DE RINGTEST 2006



Eerder in dit rapport is aangetoond dat de extractie van Anabaena met kokend water niet efficiënt is. Alle gerapporteerde data zijn dan ook laag (Figuur 27), met uitzondering van het resultaat van lab 2. Het gemiddeld gemeten microcystine gehalte was $1.68 \mu\text{g/L}$.

CLASSIFICATIE VAN DE RESULTATEN

De Z-scores (zie onderdeel 4.4.2) van de acht laboratoria zijn voor alle vier de monsters weergegeven in Tabel 10.

TABEL 10 Z-SCORES VOOR CLASSIFICATIE VAN DE MICROCYSTINE RINGTEST RESULTATEN

	Monster A	Monster B	Monster C	Monster D
lab 1	-0,41	-0,22	-0,75	-0,73
lab 2	-0,67	1,19	1,02	2,29
lab 3	-0,64	-1,43	-0,47	-0,21
lab 4	-0,41	-0,36	-0,15	0,27
lab 5	1,19	1,70	-0,01	-0,94
lab 6	-0,55	-0,13	-0,36	-0,29
lab 7	-0,46	-0,06	-1,19	-0,34
lab 8	1,97	-0,67	1,90	-0,05

Op grond van de in onderdeel 4.4.2 genoemde criteria is alleen de kwaliteit van de analyse van monster D voor Lab 2 twijfelachtig en zijn alle overige waarden acceptabel. Dit beeld is echter vertekend doordat het gemiddelde van de extreme waarden die door Lab 8 werden waargenomen (zie Tabel 8) nog in de buurt van het algehele gemiddelde komen. Dit blijkt ook uit relatieve standaard deviaties (%sd) van de gemiddelde gehalten van laboratoria die meer dan 1 analyseresultaat hebben gerapporteerd (Tabel 11).

TABEL 11 RELATIEVE SPREIDING (%SD) VAN DE MICROCYSTINE RINGTEST RESULTATEN

	Monster A	Monster B	Monster C	Monster D
lab 1	5%	25%	22%	4%
lab 2	-	-	-	-
lab 3	-	-	-	-
lab 4	27%	17%	4%	18%
lab 5	-	-	-	-
lab 6	2%	1%	12%	0%
lab 7	14%	26%	11%	25%
lab 8	126%	84%	53%	-

VERGELIJKING TUSSEN EXTRACTIEMETHODEN

Laboratoria 2 en 8 hebben als alternatieve methode de 3x vries-dooi extractie gebruikt. Bij lab 2 zijn, met uitzondering van monster A, de resultaten lager dan die met de aanbevolen extractiemethode zijn bepaald. De resultaten van lab 8 waren met beide extractiemethoden zeer variabel. In experiment A van dit onderzoek is aangetoond dat de vries-dooi methode in sommige gevallen goed werkt, maar dat het gemiddelde rendement lager is en de spreiding groter is dan van de extractie in kokend water. Laboratorium 3 heeft als enige niet gewerkt met het aanbevolen protocol. Op dit lab werd een groter volume in reageerbuizen geëxtraheerd in kokend water, zonder methanol toevoeging. Bij monster B werd een duidelijk lager rendement gevonden dan het gemiddelde. Laboratorium 5 heeft de extractie ook uitgevoerd met een meer tijdrovende eigen methode waarbij het water werd gefiltreerd en het filter met de cellen werd geëxtraheerd met 75% methanol. Hoewel met deze methode alleen het extracellulaire microcystine werd gemeten zijn de resultaten goed vergelijkbaar met de aanbevolen extractiemethode.

CONCLUSIES RINGTEST

Concluderend kan worden gezegd dat de resultaten van de ringtest in het algemeen bevredigend zijn, met name voor de monsters met een *Microcystis* dominantie. Er moet echter naar worden gestreefd om de kwaliteit van de extractie en analyse van monsters met *Planktothrix* dominantie in de toekomst verder te verbeteren. De extractiemethode blijkt niet betrouwbaar te zijn voor de analyse van monsters met *Anabaena* dominantie.

5

DISCUSSIE

De resultaten van dit onderzoek dragen bij tot de doelstellingen van het project “Cyanotoxine monitoring: standaardisering en validatie van methoden voor de Nederlandse waterkwaliteitsbeheerders”.

SELECTIE VAN SNELLE EN SIMPELE EXTRACTIEMETHODE VOOR CYANOTOXINES

In het CIW protocol zijn naast de tijdrovende Fastner extractie 3 methoden aangegeven om monsters van oppervlaktewater te extraheren: 1. met een ultrasoon probe (1 minuut), 2. met een kokend waterbad (1 minuut) en 3. met een magnetron (9 minuten). Daarnaast wordt in Nederland ook de methode van herhaald invriezen en ontdooien gebruikt (Utkilen en Gjølme, 1994). In de literatuur worden wel snelle extractiemethoden beschreven (Metcalf en Codd, 2000), maar een goede vergelijking van het rendement en de reproduceerbaarheid van de bovenvermelde methoden ontbreekt. In deze studie zijn duidelijke verschillen in rendement en reproduceerbaarheid aangetoond tussen de verschillende methoden. Op grond van de criteria dat de methode betrouwbaar, snel en simpel moet zijn is geconcludeerd dat de cel-extractie in een kokend waterbad het meest geschikt is om toe te passen bij de monitoring van cyanotoxines in de Nederlandse wateren.

OPTIMALISATIE EXTRACTIEMETHODE

Hoewel door Metcalf en Codd (2000) een kooktijd van 1 minuut als voldoende werd aangegeven lijkt het niet zinvol om deze korte kooktijd aan te houden met een monstervolume van 2 ml. Het monster zal namelijk enkele minuten nodig hebben om op te warmen in het waterbad en daarnaast is uit door Waternet uitgevoerde proeven gebleken dat de reproduceerbaarheid van een cel-extractie met 10 minuten koken onvoldoende was. Op grond van de resultaten van het hier beschreven onderzoek lijkt een kooktijd van 30 minuten optimaal.

In een artikel van Hyenstrand et al. (2001) wordt aangetoond dat de resultaten van microcystine kunnen worden beïnvloed door de binding van deze stoffen aan de plastic onderdelen (bewaarvaatjes, pipetpuntjes, injectiespuiten etc.) waarmee ze tijdens de extractieprocedure in contact komen. Deze binding kan worden voorkomen door toevoeging van methanol. Omdat de ELISA analyse echter door methanol kan worden verstoord (Metcalf en Codd, 2000) werd er bij voorkeur geen gebruik van gemaakt. De ELISA analyse is echter zo gevoelig dat er bij microcystine gehalten boven 1,6 µg/L een verdunning van het extract moet worden gemaakt. Monsters met gehalten rond de zwemwaternormen (10 en 20 µg/L) zullen dus altijd worden verdund. Daarom is het mogelijk om de cel-extractie uit te voeren bij hoge methanolconcentraties, waarna het gefiltreerde extract met demi water zodanig wordt verdund dat het methanol gehalte in het eindextract voor de ELISA analyse onder de kritische grens van 5% ligt. Uit onze studie bleek dat toevoeging van 50% methanol aan het monster een positieve invloed had op het rendement en de reproduceerbaarheid van de extractie. Blijkbaar wordt door de methanol toevoeging voorkomen dat een significante hoeveelheid van het aanwezige microcystine verloren gaat door binding aan plastics. De methanol toevoeging kan niet wor-

den toegepast als de monsters onverdund worden geanalyseerd, bijvoorbeeld voor een toetsing aan de drinkwaternorm van 1 µg/L.

Omdat in eerste aanleg werd verondersteld dat de ELISA analyse moest worden uitgevoerd met heldere extracten werden de ruwe extracten gecentrifugeerd en gefiltreerd. Uit nader onderzoek bleek echter dat deze stappen niet nodig zijn, zodat het extractieprotocol nog simpeler kan worden gemaakt. Het is echter wel nodig om het ruwe extract zeer goed te homogeniseren voor de ELISA analyse om een hoge spreiding van de resultaten te voorkomen.

VERGELIJKING ELISA EN HPLC ANALYSE

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

KWALITEIT MICROCYSTINE ANALYSE

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

MICROSCOPISCH ONDERZOEK

Bij de vergelijking tussen de snelle extractiemethoden (experiment A) is uitsluitend gekeken naar het extractierendement (de opbrengst van microcystine) en de reproduceerbaarheid van de extractie. Er werd niet onderzocht of de cyanobacteriën daadwerkelijk kapot werden gemaakt tijdens de extractie. Uit een microscopisch onderzoek bleek dat bij geen van de

onderzochte soorten cyanobacteriën (Anabaena, Microcystis en Planktothrix) de cellen kapot gingen tijdens de extractie omdat de aantallen hele cellen voor en na de extractie niet duidelijk verschilden. Bij Anabaena en Microcystis werd na de extractie wel een afname van de celdiameter waargenomen, waaruit blijkt dat een deel van de celinhoud werd uitgescheiden. Bij Planktothrix werd geen afname van de celdiameter aangetoond. Uit de microcystine analyses bleek de extractie geen effect te hebben bij Anabaena omdat het microcystine gehalte voor en na de extractie nauwelijks meetbaar was. Bij Microcystis werd echter een grote hoeveelheid microcystine aangetoond na de behandeling met methanol in kokend waterbad, terwijl voor het koken vrijwel geen microcystine werd aangetoond. Bij Planktothrix blijkt het microcystine gehalte ook zonder extractie hoog te zijn. Er is aangetoond dat microcystine zowel in laboratoriumkweken als in veldmonsters met Planktothrix dominantie ook zonder koken al extracellulair aanwezig is. Mogelijk is de celwand van Planktothrix goed doorlaatbaar voor microcystine. Keil et al. (2002) toonden aan dat cyanotoxines goed uit Planktothrix kunnen worden geëxtraheerd met polaire oplossingen (zowel methanol als water).

RINGTEST 2006

De resultaten van de ringtest monsters die met de aanbevolen methode werden geëxtraheerd bleken redelijk tot goed overeen te komen voor de monsters van een kweek met Microcystis en een veldmonster met Microcystis dominantie. De relatieve variatie was bij deze monsters minder dan 30% als de uitbijters buiten beschouwing worden gelaten. De interlab variatie was groter bij de monsters van een Planktothrix kweek en een veldmonster met Anabaena dominantie. Op grond van de classificatie met Z-scores van de gemiddelde waarden per lab bleek slechts één resultaat van twijfelachtige kwaliteit ($2 < |Z| < 3$). Hierbij moet echter worden aangetekend dat de individuele resultaten van een van de laboratoria een zeer grote spreiding vertoonden, maar dat de gemiddelde waarden hiervan nog net een Z-score kleiner dan 2 haalden. De verschillen tussen de microcystine resultaten na extractie met de aanbevolen methode en de resultaten met de eigen methoden van enkele laboratoria waren niet groot. De monsters moesten worden ingevroren voordat ze naar de laboratoria werden verstuurd. Door het invriezen is een groot deel van de cellen beschadigd, zodat de meerderheid van de microcystines al extracellulair in het monster aanwezig was (gemeten door laboratorium 5). Hoewel het logistiek zeer lastig is lijkt het nuttig om een vervolg ringtest uit te voeren met verse monsters. De reproduceerbaarheid van de microcystine analyse is onderzocht in een internationale ringtest, georganiseerd door Juan Ribo van de Universiteit van Catalonië (Barcelona, Spanje). Helaas hebben alleen de laboratoria 1, 5, 6 en 8 met de beide ringtesten meegedaan.

BEMONSTERINGSPROTOCOL

Met de richtlijnen voor bemonstering is in 2005 een aanzet gegeven tot uniforme werkwijze bij alle waterkwaliteitsbeheerders. Naar aanleiding van commentaren van belanghebbenden (waterschappen, provincies en Rijkswaterstaat) is het bemonsteringsprotocol in 2006 aangescherpt en op enkele punten duidelijker gemaakt. De uitkomsten van het in dit rapport beschreven onderzoek maken duidelijk dat een analyse van de soortensamenstelling zeer belangrijk is voor de interpretatie van de microcystine analyse. Het definitieve bemonsteringsprotocol is als bijlage 1 in dit rapport opgenomen.

EXTRACTIEPROTOCOL

Bij het nader onderzoek naar de optimalisering van de extractiemethode werd aangetoond dat het protocol verder kon worden versimpeld. Het is voor de ELISA analyse niet noodzakelijk om met een helder extract te werken zodat het filtreren en centrifugeren achterwege kan

blijven. Optioneel kunnen deze nabehandelingen worden toegepast bij zeer geconcentreerde monsters waarvan het extract moeilijk nauwkeurig kan worden gepipetteerd. Het herziene 'Protocol voor de extractie van oppervlaktewater met *Microcystis* of *Planktothrix* dominantie voor de ELISA analyse van microcystines' is als bijlage 2 in dit rapport opgenomen.

SAMENVATTENDE CONCLUSIES

Op grond van alle resultaten van dit onderzoek lijkt het aanbevolen extractieprotocol betrouwbaar voor monsters met een *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie. Het protocol is echter ongeschikt voor monsters met *Anabaena* dominantie. Het bleek dat ook de overige snelle extractie-methoden die zijn onderzocht, zoals vries-dooi, magnetron en ultrasoon, voor *Anabaena* minder efficiënt waren dan de Fastner methode (experiment A3). In experiment A1 is aangetoond dat het microcystine gehalte van een mengsel van op de UvA gekweekte cyanobacteriën (*Anabaena*, *Microcystis* en *Planktothrix*) dat was geëxtraheerd met het aanbevolen protocol goed overeen kwam met de gehalten die werden aangetoond na de Fastner extractie. Als de microcystine gehalten in *Anabaena* hoog zouden zijn, dan zou er een duidelijk verschil zichtbaar moeten zijn tussen deze gehalten. Doordat de extractie-efficiëntie sterk kan variëren voor de verschillende algensoorten is het belangrijk om bij elk geval van algenbloei een monster te onderzoeken op de soortensamenstelling.

AANBEVELINGEN

Het aanbevolen extractieprotocol wordt als betrouwbaar beschouwd voor monsters met *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie. Het is van groot belang dat de globale soortensamenstelling in milieumonsters wordt bepaald omdat het extractierendement van de aanbevolen methode afhankelijk blijkt te zijn van de bacteriesoort. Bij elk geval van algenbloei zal dus microscopisch onderzoek moeten worden uitgevoerd om de dominante soorten te bepalen. Bij *Microcystis* en *Planktothrix* dominantie kunnen de risico's voor de zwemmer worden bepaald met een microcystine analyse na extractie volgens het protocol van bijlage 2. De risico's voor zwemmers in water waarin *Anabaena* dominant is kunnen worden bepaald op grond van het aantal cellen per ml. Volgens het WHO rapport van Chorus en Bartram (WHO, 1999) is een dichtheid van 100.000 cellen/ml de richtlijn voor een verhoogd alarm vanwege de grotere kans op nadelige effecten en de mogelijke vorming van drijfslagen. Omdat er steeds vaker blauwalgen soorten worden waargenomen die naast microcystine ook andere cyanotoxines vormen (zoals anatoxine) zullen de risico's voor de zwemmers in de toekomst meer op celantallen en biovolume dan op toxinegehalten worden beoordeeld. Het nieuwe Blauwalgen protocol, dat waarschijnlijk vanaf 2009 wordt gehanteerd, zal hierop zijn gebaseerd. De microcystine analyse kan daarnaast optioneel worden toegepast bij een dominantie van *Microcystis* of *Planktothrix*, maar zal geen integraal onderdeel meer uitmaken van de risicoanalyse.

6

LITERATUUR

- CIW (Commissie Integraal Waterbeheer), 2002. Veilig zwemmen: cyanobacteriën in zwemwater. Aangepast protocol 2002.
- Fastner, J., Flieger, I. and Neumann, U. 1998 Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. *Wat. Res.*, 32: 3177-3181.
- Gezondheidsraad, 2001. Microbiële risico's van zwemmen in de natuur: Gezondheidsraad Den Haag; Publ. Nr. 2001-/25. ISBN 9055494011.
- Harada, K.-I. 1996 Chemistry and detection of microcystins. In: M.F. Watanabe, K.-I. Harada, W.W. Carmichael and H. Fujiki [Eds] *Toxic Microcystis*, Chemical Rubber Company (CRC) Press, Boca Raton, Florida, pp. 103-148
- Hyenstrand, P., J.S. Metcalf, K.A. Beattie and G.A. Codd, 2001. Losses of cyanobacterial toxin microcystin-LR from aqueous solution by adsorption during laboratory manipulations. *Toxicon* 39: 589-594.
- ISO, 2005. Water quality -- Determination of microcystins -- Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection [under development]
- Keil C, Forchert A, Fastner J, Szewzyk U, Rotard W, Chorus I, Kratke R, 2002. Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Res.* 36:2133-2139.
- Krot, B. en P.M. 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 in opdracht van RIZA.
- Mels, C., 2001. Microcystines in cyanobacteriën: onderzoek naar de toepasbaarheid van HPLC-DAD en ELISA. HLO verslag van stage bij RIZA, Hogeschool Zeeland te Vlissingen.
- Metcalf, J. S. and G. A. Codd, 2000. Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *Fems Microbiology Letters* 184: 241-246.
- Metcalf, J.S., P. Hyenstrand, K.A. Beattie and G.A. Codd, 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *Journal of Applied Microbiology* 89: 241-246.
- Meulenberg, 2000. Bepaling van microcystines in oppervlaktewater en drijfslagen met behulp van een immunoassay. ELTI-Support Nijmegen. ELTI-rapport 2000-2.
- Nicholson, B.C., and M.D. Burch, 2001. Evaluation of analytical methods for detection and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water guidelines. Report prepared for the National Health and Medical Research Council of Australia, the Water Services Association of Australia, and the Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment. AusInfo, Canberra, Australia. ISBN 1864960949.
- Peelen, G., 2005. Application of the ELISA in the environmental laboratory for water quality control. Presentatie op "First Inter-laboratory Comparison Exercise for the Microcystine Test" meeting, Nieuwegein.
- RIZA 2002. Auteurs: Kirsten Wolfstein en Margriet Roukema. Blauwalgen, cyanobacteriën. Brochure DG Rijkswaterstaat.

- STOWA, 2000. Toxische blauwalgen in recreatiewateren. Rapport 2000-20, ISBN 9057731150.
- Utkilen, H. and Gjølme, N. 1994 A simple and rapid method for extraction of toxic peptides from cyanobacteria. In: G.A. Codd, T.M. Jefferies, C.W. Keevil and E. Potter [Eds] Detection Methods for Cyanobacterial Toxins, Special Publication No. 149, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 168-171.
- Van der Oost, R., 2004. Analyse van cyanotoxines in oppervlaktewater. Cyanobacteriën Nieuwsbrief 4.
- WHO, 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management, I. Chorus and J. Bartram (Eds.). World Health Organization, Geneva.

BIJLAGE 1

**PROTOCOL VOOR HET NEMEN VAN
OPPERVLAKTEWATERMONSTERS VOOR
ONDERZOEK NAAR TOXINES VAN
CYANOBACTERIËN EN VOOR DE ANALYSE
VAN DE ALGENSAMENSTELLING**

1 DOEL

Het doel van dit voorschrift is om richtlijnen te geven voor monsterneming van cyanobacteriën (blauwalgen, blauwwieren) in oppervlaktewater. Dit voorschrift is samengesteld door de landelijke werkgroep Cyanobacteriën. Het is een van de onderdelen van een STOWA studie om tot vergelijkbare procedures te komen voor het beoordelen van de risico's van cyanobacteriën in alle Nederlandse wateren.

2 TOEPASSINGSGBIED

Dit protocol is een meer verfijnde uitwerking van het protocol van De Commissie Integraal Waterbeheer (CIW-protocol). Het is van toepassing bij de volgende situaties:

- Als op of nabij een zwemwaterlocatie drijfslagen van cyanobacteriën worden waargenomen in of net buiten het zwembegebied.
- Als er een cyanodominantie zichtbaar is die (nog) niet heeft geleid tot de vorming van drijfslagen.
- Als een locatie verdacht is vanwege:
 - gezondheidsklachten van zwemmers
 - recent verdwenen drijfslaag
 - overige aanwijzingen die op cyanodominantie kunnen wijzen (pH en doorzicht)
 - een slechte reputatie (problemen met cyanobacteriën in voorgaande jaren)
 -

3 DEFINITIES

Drijfslaag Min of meer aaneengesloten laag van algen waar je niet of nauwelijks doorheen kunt kijken met een oppervlakte van minimaal 1m².

Cyanodominantie Zichtbare dominantie van cyanobacteriën in de waterkolom in de vorm van kolonies bestaande uit klontjes (aaneenplakte losse cellen) of vlokjes (draadjes / sprietjes). De kolonies zijn meestal lichtgroen, maar kunnen er ook lichtblauw, bleekgroen tot bijna wit uitzien. Daarnaast zijn er ook soorten die in losse draadjes groeien en geen kolonies vormen en daardoor moeilijker met het blote oog te herkennen zijn. In een monster met deze soort bacteriën kan vaak een wirwar van zwevende draadjes gezien worden. Het water ziet er dan uit als een 'groene soep'. Niet toxische algensoorten (bv. Groenalgen) bestaan zelden uit alleen maar kleine draadjes en veroorzaken in mindere mate een groene soep.

Meer informatie is te vinden in de folder "Herkenning cyanobacteriën in het veld", te vinden op www.stowa.nl onder 'thema cyanobacteriën': http://themas.stowa.nl/Themas/Richtlijnen_bemonstering_.aspx?rID=1050

4 TOESTELLEN EN HULPMIDDELEN

- 4.1 Groene glazen monsterfles met een brede hals en inhoud van 250 ml (voor ELISA analyse) of een glazen groene monsterfles met inhoud van 1 liter (voor HPLC analyse).
- 4.2 Glazen monsterfles met inhoud van 1 liter (voor soortensamenstelling).
- 4.3 Steekbuis voor nemen van watermonsters in de waterkolom.
- 4.4 Emmer met touw.
- 4.5 Thermometer
- 4.6 PH-meter
- 4.7 Zuurstofmeter
- 4.8 Kunststof wegwerphandschoenen en “tuinhandschoenen”.
- 4.9 Secchi schijf met bevestigingsdraad, voorzien van een maatverdeling om de 20 cm.
- 4.10 Topografische atlas met ingetekende monsterpunten, schaal 1:25.000
- 4.11 Fotomap van de monsterpunten.
- 4.12 (Dienst)auto; geschikt voor transport van monsters en hulpmiddelen.
- 4.13 Een (elektrische) koelkast in elke monsternemingauto, aangesloten op de accu van de auto. Voorzien van een thermometer.
- 4.14 Koelbox met koelelementen indien er geen koelkast aanwezig is. Controleer de temperatuur in de koelbox m.b.v. een thermometer.
- 4.15 Een fototoestel.
- 4.16 Lieslaarzen.
- 4.17 Windmeter (optioneel)

5. WERKWIJZE

5.1 VOORBEREIDING

Controleer vóór vertrek of benodigde toestellen en hulpmiddelen (4) aanwezig zijn.
 Neem de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen met betrekking tot veiligheid en gezondheid.
 Gebruik handschoenen (4.8) en afhankelijk van de situatie lieslaarzen (4.16).
 Zet de koelkast (4.13) aan of neem een koelbox (4.14) met bevroren elementen mee.

5.2 STRATEGIE: WANNEER EN WAAR BEMONSTEREN?

Bij de bemonsteringslocatie moet het 'veldformulier bemonsteren van cyanobacteriën' (appendix 1) zo volledig mogelijk worden ingevuld als er reden voor bemonstering is. Er moeten per monsterlocatie watermonsters worden genomen voor analyse op cyanobacteriën en cyanotoxines bij de volgende vier situaties:

I. EEN DRIJFLAAG IN HET ZWEMGEBIED

Er moeten op minimaal twee plaatsen van het zwembad monsters worden genomen:

- i) in de drijfslag in het zwembad
- ii) buiten de drijfslag, maar binnen het zwembad.
 Optioneel: bij een drijfslag met een omvang van meer dan 100 m² wordt aanbevolen de drijfslag op meerdere plaatsen te bemonsteren

II. EEN DRIJFLAAG BUITEN HET ZWEMGEBIED (MAXIMAAL 500 METER AFSTAND)

Er moeten op twee plaatsen monsters worden genomen:

- in de drijfslag buiten het zwembad
- ii) op de normale plaats binnen het zwembad.

III. CYANODOMINANTIE IN HET ZWEMGEBIED

Er moeten op één plaats in het zwembad monsters worden genomen.

IV. GEEN DRIJFLAAG, MAAR DE LOCATIE IS "VERDACHT":

- a door gezondheidsklachten*
- b als een bestaande drijfslag is verdwenen**
- c andere indicaties voor verhoogd risico (pH of doorzicht)***
- d door reputatie****

Er moeten op één plaats in het zwembad monsters worden genomen.

* : Bij gezondheidsklachten die mogelijk met cyanobacteriën te maken hebben moet altijd een monster worden genomen

** : Als er recent giftige cyanobacteriën en toxinen zijn aangetoond moet de locatie bemonsterd worden zodra de drijfslag is verdwenen, zodat de beheerder weet of het microcystine gehalte onder de norm ligt om een zwembadverbod op te kunnen heffen.

*** : Optioneel: er wordt geadviseerd om een monster nemen voor soortensamenstelling als de pH groter dan 9 is en/of het doorzicht minder dan 1 meter is.

**** : Optioneel: als een plas de reputatie heeft dat er in voorgaande jaren problemen met giftige cyanobacteriën waren, dan wordt geadviseerd om deze plas preventief te bemonsteren voor soortensamenstelling wanneer er op andere locaties in het beheersgebied giftige cyanobacteriën worden aangetroffen.

5.3 UITVOERING: HOE EN HOEVEEL BEMONSTEREN?

Bepaal met behulp van de folder 'Herkenning Cyanobacteriën in het veld' of op de locatie een drijfslaag of cyanodominantie aanwezig is. In alle situaties moeten de monsters in tweevoud worden genomen! Het eerste monster dient voor bepaling van cyanotoxinen (microcystine). Het tweede monster dient voor de bepaling van een globale algensamenstelling van het te onderzoeken monster.

- Bemonster een doorzichtige plastic of glazen fles van 250 ml of 1 liter halfvol voor de microcystine analyse (volume is afhankelijk van de analysemethode). De fles moet voor de helft worden gevuld zodat het monster goed gehomogeniseerd kan worden door schudden. Het uitvoeren van een microcystine analyse is alleen zinvol wanneer er in de fles na minimaal een uur in de laboratorium koelkast een drijfslaagje zichtbaar wordt.
- Bemonster een fles van 1 liter voor de bepaling van de globale algensamenstelling (volume is afhankelijk van de gebruikte methode).

Hieronder wordt per situatie aangegeven hoe er bemonsterd moet worden:

A. EEN DRIJFLAAG

- Neem het monster op de plek waar de drijfslaag het dikst is.
- Plaats de fles schuin in de drijfslaag, de opening van de fles net onder het wateroppervlak, zodat de drijfslaag in het flesje spoelt.

B. CYANODOMINANTIE

- Neem het monster op de plek waar de cyanodominantie het meest duidelijk is (bijv. een "wolk" van cyanobacteriën).
- Gebruik een steekbuis voor een verticale bemonstering van de waterkolom tot een diepte van 50 cm, en breng het water over in een schone emmer. Indien geen steekbuis aanwezig is kan het water ook rechtstreeks met een emmer worden bemonsterd.
- Giet het water uit de emmer met een trechter in de monsterflessen.
- NB. Het is alleen zinvol om een microcystine analyse op dit monster uit te voeren als er op het laboratorium in de fles een drijfslaagje zichtbaar is!

C. GEEN DRIJFLAAG

- Neem het monster op de plek waar de reguliere bemonstering plaatsvindt
- Gebruik een steekbuis voor een verticale bemonstering van de waterkolom tot een diepte van 50 cm, en breng het water over in een schone emmer. Indien geen steekbuis aanwezig is kan het water ook rechtstreeks met een emmer worden bemonsterd.
- Giet het water uit de emmer met een trechter in de monsterflessen.
- NB. Het is alleen zinvol om een microcystine analyse op dit monster uit te voeren als er op de locatie gezondheidsklachten zijn waargenomen of als na het verdwijnen van een drijfslaag wordt gecontroleerd of een zwemverbod kan worden opgeheven.

6. TRANSPORT, BEWAREN EN CONSERVEREN

Voorzie de bemonsteringsflessen van stickers met eenduidige herkenning-informatie.

Plaats na monsternamen de flessen in een donkere koelkast (4.12) of koelbox (4.13).

Controleer in het geval van cyanodominantie of er een drijflaagje zichtbaar is in de fles en besluit aan de hand hiervan of er een microcystine analyse moet worden uitgevoerd.

Neem het monster binnen 24 uur in behandeling.

Als de monsters niet binnen vereiste tijd in behandeling genomen worden, moeten ze in de koelkast bewaard worden. Monsters voor microcystine analyse kunnen evt. ook worden ingevroren.

Conserveer monsters voor microscopisch onderzoek die langer dan 48 uur bewaard moeten worden met lugol (1:100 verhouding lugol:water).

7. INTERPRETATIE VAN ANALYSEGEDEGENS

I. EEN DRIJFLAAG IN HET ZWEMGEBIED

- monster(s) in een drijflaag in het zwembad

Hiermee worden de risico's van giftige cyanotoxines of blauwalgen voor de zwemmers bepaald.

Als het microcystine gehalte hoger dan 10 µg/L of 20 µg/L is kan resp. een waarschuwing of een zwemverbod worden afgevaardigd. Als er met microscopisch onderzoek een grote hoeveelheid van giftige soorten blauwalgen (> 100.000 cellen/ml) wordt gevonden kan ook een zwemverbod worden afgevaardigd.

- monster buiten de drijflaag, maar binnen het zwembad.

Hiermee worden de risico's voor zwemmers buiten de drijflaag bepaald. Als het gehalte aan microcystine lager is dan 10 µg/L kan worden vastgesteld dat de risico's voor de zwemmer na het verdwijnen van de drijflaag niet groot zullen zijn.

II. EEN DRIJFLAAG BUITEN HET ZWEMGEBIED (MAXIMAAL 500 METER AFSTAND)

- monster in de drijflaag buiten het zwembad

Hiermee worden de risico's van giftige cyanotoxines of blauwalgen buiten het zwembad bepaald. Als er een verhoogd risico is kan hiermee rekening worden gehouden als de drijflaag door de wind het zwembad in wordt geblazen. Er is een verhoogd risico bij microcystine gehalte hoger dan 20 µg/L of als er met microscopisch onderzoek een grote hoeveelheid van giftige soorten blauwalgen (> 100.000 cellen/ml) wordt gevonden.

- monster op de normale plaats binnen het zwembad.

Hiermee worden de risico's van giftige cyanotoxines of blauwalgen voor de zwemmers bepaald. Als het microcystine gehalte hoger dan 10 µg/L of 20 µg/L is kan resp. een waarschuwing of een zwemverbod worden afgevaardigd. Als er met microscopisch onderzoek een grote hoeveelheid van giftige soorten blauwalgen (> 100.000 cellen/ml) wordt gevonden kan ook een zwemverbod worden afgevaardigd.

III. CYANODOMINANTIE IN HET ZWEMGEBIED

- monster op de normale plaats binnen het zwemgebied.

Hiermee worden de risico's van giftige cyanotoxines of blauwalgen voor de zwemmers bepaald. Als het microcystine gehalte hoger dan 10 µg/L of 20 µg/L is kan resp. een waarschuwing of een zwemverbod worden afgevaardigd. Als er met microscopisch onderzoek een grote hoeveelheid van giftige soorten blauwalgen (> 100.000 cellen/ml) wordt gevonden kan ook een zwemverbod worden afgevaardigd.

IV. GEEN DRIJFLAAG, MAAR DE LOCATIE IS "VERDACHT"

monster op de normale plaats binnen het zwemgebied.

Hiermee worden de risico's van giftige cyanotoxines of blauwalgen voor de zwemmers bepaald. Als het microcystine gehalte hoger dan 10 µg/L of 20 µg/L is kan resp. een waarschuwing of een zwemverbod worden afgevaardigd. Als er met microscopisch onderzoek een grote hoeveelheid van giftige soorten blauwalgen (> 100.000 cellen/ml) wordt gevonden kan ook een zwemverbod worden afgevaardigd.

APPENDIX 1

VELDFORMULIER BEMONSTEREN VAN CYANOBACTERIËN

Naam monsterpunt : _____ Datum monsterneming : _____

Code monsterpunt : _____ Naam onderzoeker : _____

VELDWAARNEMINGEN

Drijfslaag aanwezig* : JA / NEE; indien ja: BINNEN / BUITEN ZWEMGEBIED _____

Dikte drijfslaag (cm) : _____

Oppervlakte drijfslaag (m²) : _____

Kleur drijfslaag : _____

Kenmerken van de drijfslaag : _____ (aaneengesloten, los)

Cyanodominantie** : JA/NEE _____

Kenmerken dominantie : _____ (vlokken, bolletjes etc.)

Weer : _____ (regen, bewolkt, zonnig)

*: Drijfslaag Aaneengesloten laag van algen waar je niet of nauwelijks doorheen kunt kijken met een minimale oppervlakte van 1m².

** : Cyanodominantie Zichtbare dominantie van de blauwalgen in de waterkolom in de vorm van groene klontjes of vlokjes.

Locatieschets: geef de zwemzone, de drijfslaag [of cyanadominantie] en de windrichting aan

OVERIGE VELDWAARNEMINGEN & VELDMETINGEN (optioneel)

Windsterkte : _____

Weer voorafgaand : _____

Opmerkingen : _____

(bijv. dode vis/vogels, aantal zwemmers etc.)

Zichtdiepte (cm) : _____

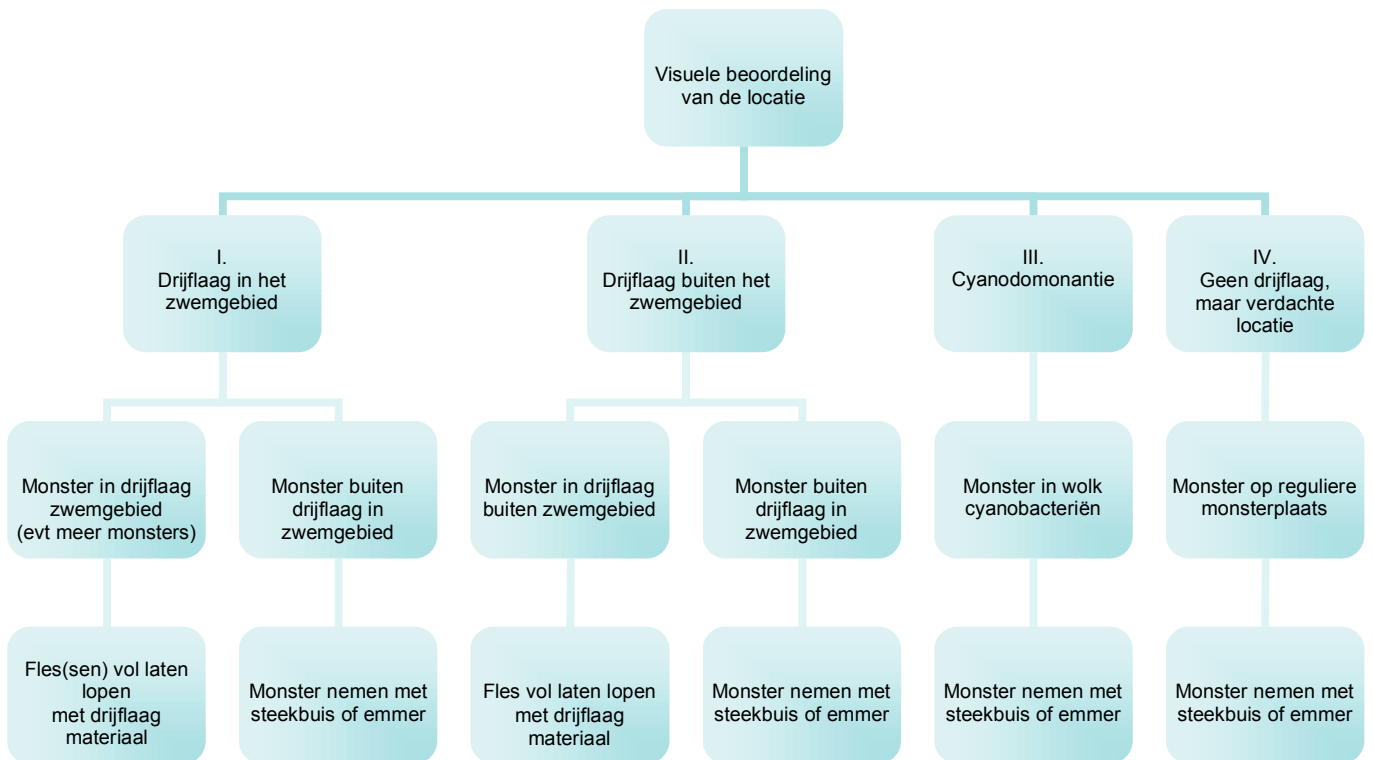
Watertemperatuur (oC) : _____

pH : _____

Zuurstof : _____

Dia- of foto (no.) : _____

APPENDIX 2: STROOMSCHEMA BEMONSTERINGS-PROTOCOL



BIJLAGE 2

**PROTOCOL VOOR DE EXTRACTIE VAN
OPPERVLAKTEWATER MET MICROCYSTIS
OF PLANKTOTHRIX DOMINANTIE VOOR DE
ELISA ANALYSE VAN MICROCYSTINES**

1 INLEIDING

In dit voorschrift wordt de voorbereiding beschreven van monsters van het oppervlaktewater waarin giftige cyanobacteriën (blauwalgen, blauwwieren) van de soort *Microcystis* voorkomen. Het voorschrift beschrijft een snelle en betrouwbare methode voor de extractie van microcystines uit *Microcystis* cellen in water. Het voorschrift is alleen geschikt voor de ELISA analyse.

Dit protocol is samengesteld door de landelijke werkgroep Cyanobacteriën. Het is een van de onderdelen van een studie om tot vergelijkbare procedures te komen voor het beoordelen van de risico's van cyanobacteriën in alle Nederlandse wateren.

2 TOEPASSINGSGBIED

Dit protocol is van toepassing op monsters van oppervlaktewater met de blauwalg *Microcystis*, waarvan het totaal microcystine gehalte moet worden geanalyseerd. De methode is niet geschikt voor de extractie van *Anabaena*, en er moet nog nader onderzocht worden in hoeverre de methode geschikt is voor de extractie van *Planktothrix*. Een globale kennis van de soortensamenstelling van het monster is dus nodig als dit protocol wordt gehanteerd.

3 APPARATUUR, MATERIALEN & CHEMICALIËN

- Verwarmingsplaat
- Bekerglas, 2 L
- Kooksteentjes
- Plastic cryogen vaatjes, 3,5 mL (bijv. Greiner bio-one)
- Vortex mixer
- Pasteur pipetten
- Eppendorf vaatjes, 2 mL
- Methanol (99% pro analyse)

4 WERKWIJZE

HOMOGENISATIE

- Een fles die voor ca. 50% is gevuld met het water (overleg dit met de monsternemers) met cyanobacteriën wordt 1 minuut krachtig geschud. N.B. Maak bij de monsternemers duidelijk dat de fles voor microcystine analyse niet geheel gevuld moet worden om homogenisatie in de monsterfles mogelijk te maken!

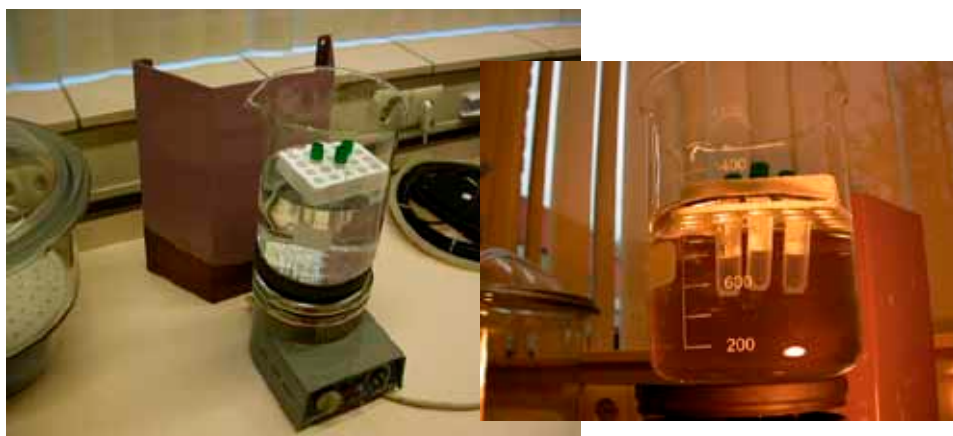
EXTRACTIE

- Een 2 L bekersglas met een ruime hoeveelheid demiwater wordt na toevoeging van kooksteentjes aan de kook gebracht op een verwarmingsplaat.
- 1,0 mL van het homogene monster (direct na het schudden!!) wordt overgebracht in een afsluitbaar 3,5 mL cryogeen vaatje.
- Aan het monster wordt 1,0 mL methanol toegevoegd. N.B. omdat de concentratie methanol in het extract voor de analyse niet hoger mag zijn dan 5% moet deze oplossing nog minimaal 10x verdund worden voordat de ELISA analyse uitgevoerd wordt (het ruwe

monster is dan 20x verdund). Als deze verdunning te hoog is (bij verwachte MC gehalten < 1.6 µg/L) moet minder methanol worden toegevoegd!

- Het vaatje wordt goed afgesloten met de plastic schroefdop.
- Het mengsel wordt gehomogeniseerd op een vortex mixer.
- Als het waterbad kookt worden de vaatjes met monster er in gebracht. Zorg dat de vloeistof in de vaatjes onder het waterniveau in het bekersglas komt zodat het contact met het kokende water optimaal is. Dit kan bijvoorbeeld door de vaatjes in een plak polystyreen of schuimrubber met geschikte openingen te steken. De schuimrubber stukken waarin de vloeistoffen van de SDI Enviroguard ELISA kit zijn verpakt zijn hiervoor zeer geschikt! De plak polystyreen/schuimrubber zal blijven drijven terwijl de vloeistof in de vaatjes onder water staat (zie figuur).

PLAATSING VAN DE CRYOGEEN VAATJES IN HET WATERBAD MET EEN POLYSTYREEN HOUDER



Nadat de vaatjes 30 minuten in kokend water hebben gelegen worden ze voorzichtig uit het waterbad gehaald en afgekoeld.

NB. er is aangetoond dat de centrifugatie* en filtratie** stappen kunnen vervallen. Alleen bij zeer geconcentreerde monsters van drijfslagen (die daardoor moeilijk pipetteerbaar zijn) kan eventueel een van deze nabehandelingen worden uitgevoerd.

Na afkoeling worden de gekookte monsters zeer goed gehomogeniseerd: drie maal 10 seconden schudden op een Vortex mixer (of vergelijkbaar apparaat).

Het eindextract moet met schoon demiwater worden verdund totdat de optimale concentratie microcystine voor de ELISA analyse in het monster zit (0.1-1.6 µg/L). Bij toevoeging van 50% MeOH moet deze verdunning minimaal 10x zijn (zie boven). NB. als er minder dan 10x moet worden verdund moet de MeOH toevoeging aan het uitgangsmateriaal worden aangepast zodat de eindconcentratie kleiner dan 5% is. Bij een verdunning van 25x wordt een range van 2,5 tot 40 µg microcystine/L gemeten, zodat kan worden gecontroleerd of de normen voor waarschuwing (10 µg/L) of zwemverbod (20 µg/L) worden overschreden. Als het exacte gehalte in een drijfslag moet worden bepaald moet het monster verder worden verdund. Op grond van ervaring kan een schatting worden gemaakt van deze hogere verdunning. Omdat de gehalten per drijfslag echter sterk kunnen variëren, is het verstandig om meerdere verdunningen in te zetten.

ANALYSE

De ELISA analyse wordt uitgevoerd volgens het standaard protocol van de kit.

OPTIONEEL BIJ ZEER GECONCENTREERDE MONSTERS:

CENTRIFUGATIE*

Na afkoelen wordt de inhoud van de cryogeen vaatjes met een Pasteur pipet overgebracht in 2 mL Eppendorf vaatjes.

De Eppendorf vaatjes worden 3 minuten in de centrifuge afgedraaid bij maximaal toerental (13.000 rpm).

FILTRATIE**

De bovenstaande vloeistof wordt na het centrifugeren overgebracht in een plastic injectie-spuit met een 0,45 μ filteropzet.

De eerste druppels van de gefiltreerde vloeistof worden weggegooid en de rest (ca. 1 ml) wordt als eindextract opgevangen in een Eppendorf vaatje.