Auteur(s): Edwin Kardinaal (KWR), Bart Wullings (KWR) en Bas van der Zaan (Deltares) - Laatst aangepast woensdag 27 februari 2013 15:42

**Ieder voorjaar, wanneer de eerste zonnestralen zich weer laten zien, maakt Nederland zich op voor zonrijke zomers waarin weer veelal verkoeling gezocht zal worden langs meren, plassen en stadsvijvers. Dergelijk vertier wordt maar al te vaak verpest door de aanwezigheid van grote hoeveelheden blauwalgen (ook wel cyanobacteriën genoemd). Blauwalgen vormen namelijk een gezondheidsrisico voor mens en dier.**

Voorbeeld daarvan is de dood van enkele honden langs de Randmeren en in de kop van Noord-Holland in 2011 (Almere Dichtbij 25 mei 2001; De Telegraaf 30 september 2011). De gezondheidsrisico's zijn vooral het gevolg van gifstoffen die door de diverse blauwalgensoorten aangemaakt kunnen worden. Het wel of niet produceren van de gifstoffen verschilt binnen een soort weer per ondersoort (stam). De totale giftigheid van het water wordt zodoende bepaald door de samenstelling van de blauwalgenpopulatie zowel op soort- als op stamniveau. Het tijdig signaleren van soorten en stammen die gifstoffen kunnen produceren is daarmee van cruciaal belang om snel maatregelen te kunnen treffen.

Sinds de beginjaren 2000 is er in Nederland voor waterbeheerders een protocol beschikbaar waarin toegelicht wordt hoe te handelen in het geval van (overmatige) blauwalgenbloei. De eerste versies van het protocol (opgesteld door Gezondheidsraad, in 2001) richtten zich op de aanwezigheid van de gifstof microcystine (een natuurlijke gifstof die past in het rijtje van curare en cobratoxine). Microcystine is de meest algemeen voorkomende gifstof die door blauwalgen geproduceerd kan worden. Langdurige blootstelling aan de stof kan leiden tot leverschade. Naast microcystine kunnen de verschillende blauwalgsoorten ook andere gifstoffen produceren waaronder saxitoxine en anatoxine. Dergelijke stoffen hebben een effect op het zenuwstelsel en kunnen direct na inname leiden tot verlammingsverschijnselen of zelfs een acute dood (Faassen et al., 2012). Door alleen te focussen op microcystine schiet een dergelijk protocol dus tekort. Het uitbreiden van het protocol met meerdere gifstoffen is lastig: er zijn geen goede richtlijnen voorhanden over gevaarlijke concentraties, en meetmethoden zijn specialistisch en daarmee prijzig. Naar aanleiding hiervan is er sinds 2009 een blauwalgenprotocol beschikbaar waarin de focus ligt op de (potentiële) producenten van de diverse gifstoffen. Dit heeft geleid tot een protocol waarin het kwantificeren van blauwalgencellen voorop staat.

Het goed kwantificeren van blauwalgencellen geschiedt momenteel onder een microscoop en is niet eenvoudig. Blauwalgen komen voor in vele soorten en maten en kunnen groeien in uiteenlopende vormen. Bovendien zijn ze in staat kolonies te vormen van vele tienduizenden cellen groot. Er is veel kennis en ervaring voor nodig om deze onder een microscoop te herkennen en te kwantificeren. Sinds de invoering van het Blauwalgenprotocol (2009) is men in Nederland dan ook op zoek gegaan naar een relatief eenvoudige methode die op een objectieve manier kan aangeven wat de biomassa van (potentieel) giftige blauwalgen is. Eén van die methodes is gebaseerd op het gebruik van een fluorescentiemeter. Een dergelijk apparaat bepaalt een specifiek pigment dat alle blauwalgen bezitten: het fycocyanine. Dit is een blauwachtig pigment dat net als chlorofyl (bladgroen) bijdraagt aan het invangen van zonne-energie voor de groei van de blauwalg. De



Phoca PDF

methode is snel en kan direct in het veld toegepast worden (van der Oost, 2010). Nadeel van de apparaten is dat er op geen enkele wijze onderscheid gemaakt wordt tussen (potentieel) toxische blauwalgen en blauwalgen die geen risico vormen. Als eerste indicator van de hoeveelheid blauwalgen worden momenteel fluorescentiemeters ingezet omdat deze snel zijn. Voor het instellen van een risiconiveau zijn fluorescentiemetingen echter niet betrouwbaar (Blauwalgenprotocol versie 2012).

DNA-technieken zijn een goed alternatief voor bovenstaande technieken om blauwalgen te kwantificeren. Dergelijke technieken hebben als voordeel dat ze betrouwbaar, snel, reproduceerbaar, objectief en op termijn goedkoop antwoord kunnen geven op de aanwezige hoeveelheid potentieel giftige blauwalgen. Ze vinden ook toepassing in ecologische vraagstukken, zoals het opsporen van de vissoort de grote modderkruiper (Herder et al., 2012).

KWR en Deltares hebben de afgelopen 3 jaar gewerkt aan genetische detectie en kwantificering van toxine-producerende blauwalgen met behulp van quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Bij qPCR wordt een specifiek stukje van het DNA-molecuul (het target DNA) synthetisch vermeerderd tot er voldoende is om het te kunnen detecteren. Daarvoor worden specifieke primers ontwikkeld. Dat zijn kleine stukjes DNA die enkel binden aan het target DNA. Via qPCR wordt dan enkel het target DNA vermenigvuldigd. Geschikt target DNA bij blauwalgen zijn DNA-moleculen die betrokken zijn bij het maken van fycocyanine (wat enkel bij blauwalgen voorkomt) of die betrokken zijn bij de vorming van blauwalg-gifstoffen (zoals microcystine). Het vermenigvuldigde PCR-product wordt tijdens de reactie gelabeld met een fluorescerende stof om de hoeveelheid te kunnen vaststellen. Bij KWR wordt sinds 2009 gewerkt aan qPCR van fycocyanine-genen van vier blauwalggeslachten. Deltares werkt sinds 2010 aan detectie van microcystine synthetase-genen, die betrokken zijn bij de productie van microcystine. In 2011 hebben beide instituten samengewerkt aan de genetische detectie van toxine-producerende blauwalgen in verschillende Nederlandse zwemwateren, in opdracht van RWS Waterdienst.

## Werkwijze

Bij de ontwikkeling van een qPCR methode gericht op potentieel toxische blauwalgen, is ervoor gekozen om het fycocyanine gen te detecteren. Hierbij is de aandacht in eerste instantie vooral gericht op de opsporing van de 4 meest voorkomende blauwalggeslachten: Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis en Planktothrix. Hierbij zijn voorlopig andere geslachten, zoals Woronichinia, buiten beschouwing gelaten. Op basis van wetenschappelijke literatuur zijn primer-probe combinaties onderzocht en waar nodig aangepast. De moleculaire methoden zijn toegepast op diverse celculturen die commercieel verkrijgbaar zijn. Testen wezen uit dat de ontwikkelde methoden zeer specifiek werken. Het onderscheid tussen Aphanizomenon en Anabaena bleek moeilijk vast te stellen. Op basis van taxonomie is dit al lastig maar blijkbaar ook op basis van DNA (Gugger et al., 2002). In dit onderzoek is daartoe een viertal primer-probe combinaties uitgetest. Daarvan bleek één methode zich vooral te richten op Anabaena en een ander vooral op Aphanizomenon. De overige 2 combinaties vertoonden overlap in het opsporen en



Phoca PDF

onderscheiden van beide geslachten.

Bij de ontwikkeling van een qPCR methode gericht op toxine-producerende blauwalgen, is ervoor gekozen om het microcystine-synthetase gen (mcyD) te detecteren. Microcystine is namelijk een veelvoorkomende blauwalgtoxine die door verschillende blauwalggeslachten kan worden gemaakt. Voor het geslacht Microcystis was deze methode al operationeel, maar het is ook belangrijk dat andere microcystine-producerende blauwalgen (bijv. Anabaena, Plankthotrix, Woronichinia, etc) ermee kunnen worden gedetecteerd.

Er is daarom een qPCR ontwikkeld voor een geconserveerd stuk van het microcystine-synthetase gen, mcyE genaamd, dat bij al deze geslachten voorkomt. Vervolgens is de methode getest op een aantal reincultures waarvan bekend is dat ze juist wel of juist niet microcystine kunnen produceren. Ook is het PCR-product, dus het stukje dat tijdens de analyse gesynthetiseerd wordt, voor diverse monsters geïdentificeerd. In alle gevallen bleek het inderdaad om het microcystine-synthetase gen te gaan, afkomstig van diverse blauwalggeslachten.

Met deze kennis is in 2011 een groot veldonderzoek uitgevoerd waarbij de ontwikkelde methodiek is toepast op 21 officiële zwemwaterlocaties en 8 stadsvijvers waar overlast van blauwalgen met enige regelmaat aangetroffen werd. Van elke locatie zijn de vier blauwalggeslachten geanalyseerd met behulp van qPCR en lichtmicroscopie. Aanvullend zijn de monsters geanalyseerd op de aanwezigheid van microcystine-synthetase genen.

**Resultaten veld**

In 2010 heeft KWR van 24 zwemwaterlocaties gedurende het zwemwaterseizoen monsters ontvangen en deze met behulp van qPCR geanalyseerd (Wullings et al, 2010). Uit die studie bleek een groot verschil tussen microscopisch getelde eenheden en qPCR-aantallen. Met behulp van batchproeven is echter aangetoond dat er een duidelijk verband bestaat tussen beide aantallen (Figuur 1). Op basis van deze proeven zijn conversiefactoren gedefinieerd, die vervolgens zijn toegepast op de qPCR-resultaten van de veldstudies uit 2010 en 2011. Zodoende kon beoordeeld worden in hoeverre met behulp van qPCR verkregen data vergelijkbaar zijn met tellingen zoals die uitgevoerd zijn door diverse laboratoria in het land. Er is voor deze vergelijking alleen gebruik gemaakt van microscopische gegevens waarin men daadwerkelijk ingeschat heeft hoeveel cellen er zich van de genera Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis en Planktothrix in het water bevonden.Voor de meeste locaties werd voor de dominante geslachten een significante relatie gevonden tussen de aantallen verkregen via de twee verschillende technieken.

Bovendien bleek voor een groot aantal locaties de dynamiek van de blauwalgendichtheden in de tijd, zoals die met qPCR gevonden wordt, goed overeen te komen met microscopie data (ter illustratie zie Figuur 2). Wanneer de resultaten van alle locaties vergeleken worden, vallen drie dingen op:

- Beide technieken geven resultaten in dezelfde orde van grootte (hoogste dichtheden 106 cellen/DNA kopieën per ml);
- De dynamiek van de dominante populaties is over het algemeen zeer goed



Phoca PDF

vergelijkbaar;
• Bij lagere dichtheden is op basis van DNA analyse minder populatiedynamiek waarneembaar dan op basis van de microscopische tellingen.

De waarnemingen geven aan dat celtellingen op basis van microscopie en op basis van qPCR technieken voor deze blauwalggeslachten goed met elkaar overeenkomen.

Om in te schatten welk percentage van de aanwezige Microcystis in de watermonsters ook daadwerkelijk microcystine kan produceren, zijn de resultaten van microcystine-synthetase gen qPCR (mcyD)vergeleken met totale hoeveelheid aanwezige Microcystis (dna kopieën/ml). Er blijkt een goede correlatie tussen beiden te zijn, waarbij slechts 5 à 10 % van Microcystis microcystine lijkt te kunnen produceren (Figuur 3). Vervolgens is in een groot aantal zwemwatermonsters gekeken in hoeverre de resultaten van de nieuw ontwikkelde mcyE qPCR overeenkomen met de aanwezigheid van bekende microcystine-produceerders. Er bleek een grote diversiteit te bestaan in het aandeel microcystine-produceerders van een op dat moment aanwezige populatie blauwalgen. Het aandeel microcystine-produceerders varieerde tussen zwemwaterlocaties, maar ook op één zwemwaterlocatie in de loop van het seizoen kon dit aandeel aanzienlijk fluctueren. Voor meerdere monsters bleek dat <1% van de gedetecteerde soorten microcystine kan produceren, maar in enkele gevallen werd meer dan 100% gevonden. Dit duidt op de aanwezigheid van microcystine-produceerders die momenteel nog niet met behulp van de qPCR gericht op het fycocyanine gen gedetecteerd worden. Hier worden dus potentiële microcystine-produceerders aangetoond die met de andere gebruikte methoden onopgemerkt bleven. De variatie in de hoeveelheid mcyE genen, zoals aangetoond via qPCR, maakt hiermee ineens het potentiële risico van microcystine-productie op een specifieke plek duidelijk.

## Implementatie

Analyse van fycocyanine- en toxinesynthetasegenen kan veel inzicht geven in de aanwezigheid, de ecologie en het voorkomen van verschillende geslachten van blauwalgen in Nederlandse zwemwateren en de hieraan gekoppelde gezondheidsrisico’s.

Uit het huidige onderzoek blijkt dat qPCR methoden uitermate geschikt zijn voor monitoring van (potentieel) toxische blauwalgen. De methoden geven snel en objectief inzicht in de dichtheid van cyanobacteriecellen en de potentiële toxineproductie. Met betrekking tot standaardisering en algemene toepassing in verschillende laboratoria is er nog een aantal obstakels te overwinnen. Dat kan relatief eenvoudig en op korte termijn door in de diverse laboratoria gebruik te maken van gestandaardiseerde protocollen voor DNA-extractie en qPCR, en het gebruik van een algemene standaard voor de calibratie van de methode. De verwachting is dat de spreiding tussen laboratoria minimaal zal zijn, in tegenstelling tot wat bij de gangbare microscopische technieken de praktijk is. Zeker als screenings-/monitoringsmethode biedt qPCR waterbeheerders de mogelijkheid om tijdig te reageren op eventuele problemen met potentieel (toxische) blauwalgen op zwemwaterlocaties en in overige water gerelateerde recreatiegebieden.



Phoca PDF

Auteur(s): Edwin Kardinaal (KWR), Bart Wullings (KWR) en Bas van der Zaan (Deltares) - Laatst aangepast woensdag 27 februari 2013 15:42

## Literatuur

1. NWO, Blauwalgenprotocol 2012
2. Faassen, E. J., L. Harkema, L. Begeman, M. Lurling (2012). First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. Toxicon 60,
3: 249-426. 3. Gezondheidsraad (2001). Microbiële risico's van zwemmen in de natuur. Report Health Council of the Netherlands.
4. M. Gugger, C. Lyra, P. Henriksen, A. Coute, J.F. Humbert , K. Sivonen (2002). Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera Anabaena and Aphanizomenon. Int. J. Sys. & Evol. Microbiol. 52: 1867–1880
5. Herder, J., A. Valentini & J. Kranenbarg (2012). Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. H2O 3: 25-27.
6. Oost, van der, R. (2010). Toepassing van fluorescentie bij de beoordeling van de risico's van giftige blauwalgen. Stowa report 2010-18.
7. Wullings B., D. van der Linde, M. van Oostveen, E. Kardinaal (2010). Monitoringsonderzoek voor toxische cyanobacteriën in zwemwater met qPCR in vergelijking met celtellingen. KWR rapport 2010.100. In opdracht van RWS Waterdienst.



Phoca PDF