

RIKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE, BILTHOVEN

Rapport nr 609021003

Toxische cyanobacteriën in recreatiewateren.

T. Burger-Wiersma & J.F.M. Versteegh

Oktober 1994

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van de Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid voor de Milieuhygiëne in het kader van het project Adhoc-Stoffen, projectnummer 609021.

VERZENDLIJST

- 1 Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid voor de Milieuhygiëne, ir. P.J. Verkerk
- 2 Directoraat-Generaal voor Milieubeheer, Directie Drinkwater, Water, Landbouw, hoofdafdeling Water
- 3 Plv. Directeur-Generaal Milieubeheer, dr. ir. B.C.J. Zoeteman
- 4 ir. J.F.M. van Vliet, DGM/DWL
- 5 ing. H.R. van Otterloo, DGM/DWL
- 6 drs. C. Nauta, DGM/HIMH
- 7 dr. ir. J.H. van Kessel, RIMH-Utrecht, ICB-DWL
- 8 - 16 Regionale Inspecties Volksgezondheid voor de Milieuhygiëne
- 17 ir. A.C. Sturm, Afd. Water, Dienst Milieu en Water, Provincie Groningen
- 18 ir. C. Kerstens, Afd. Waterkwaliteitsbeheer, Zuiveringsbeheer Prov. Groningen
- 19 ir. R.J. Wittebrood, Afd. Water, Hoofdgroep Waterstaat en Milieu, Prov. Friesland
- 20 ir. J.A. Los, Dienst Water en Milieuhygiëne, Prov. Drenthe
- 21 mr. W.M. de Brauw, Afd. Water, Hoofdgr. Milieu en Waterstaat, Prov. Overijssel
- 22 drs. C.L. de Vries, Afd. Water en Milieu, Prov. Flevoland
- 23 ir. M. Tiessens, Dienst Milieu en Water, Prov. Gelderland
- 24 ir. M.A. de Ruiten, Afd. Oppervlaktewaterkwaliteit, Dienst Water en Milieu, Prov. Utrecht
- 25 ir. J. Oosting, Bureau Oppervlaktewaterkwaliteit, Dienst Milieu en Water, Prov. Noord-Holland
- 26 ir. J. van der Ben, Bureau Oppervlaktewater, Dienst Water en Milieu, Prov. Zuid-Holland
- 27 ir. N. Oskam, Afd. Water en Biologie, Afd. N, Prov. Zeeland
- 28 ir. K.J. Provoost, Bureau Oppervlaktewater, Afd. Water, Dienst WMV, Prov. Noord-Brabant
- 29 C.J.M. Haessen, Bureau Oppervlaktewaterbeheer, Afd. Waterhuishouding en Landinrichting, Hoofdgr. VMW, Prov. Limburg
- 30 dr. J. van Genderen, Comm. Toxicologie, KIWA
- 31 ir. J. Willemsen-Zwaagstra, PWN
- 32 dr. W. Hoogenboezem, PWN
- 33 dr. ir. J. Schellart, GWA
- 34 drs. A.C. Hoekstra, DZH
- 35 drs. L.W.C.A. van Breemen, WBB
- 36 drs. H.A.M. Ketelaars, WBB
- 37 Zuiveringsschap Drenthe
- 38 Zuiveringsschap West-Overijssel
- 39 Heemraadschap Fleverwaard
- 40 Zuiveringsschap Veluwe
- 41 Zuiveringsschap Rivierenland
- 42 Zuiveringsschap Oostelijk Gelderland
- 43 Hoogheemraadschap Uitwaterende Sluizen Kennemerland en Westfriesland
- 44 Hoogheemraadschap Amstel en Vecht
- 45 Zuiveringsschap Amstel- en Gooiland
- 46 Hoogheemraadschap van Schieland
- 47 Hoogheemraadschap van Rijnland, ir. B. van der Veer
- 48 Zuiveringsschap Hollandse Eilanden en Waarden
- 49 Hoogheemraadschap van Delfland
- 50 Hoogheemraadschap West-Brabant
- 51 Hoogheemraadschap Alm en Biesbosch
- 52 dr. S.P. Klapwijk, STOWA
- 53 RWS, Dir. Noord-Nederland
- 54 RWS, Dir. Overijssel
- 55 RWS, Dir. Flevoland, mevr. drs. T.H. Helmerhorst
- 56 RWS, Dir. Gelderland
- 57 RWS, Dir. Utrecht

58	RWS, Dir. Noord-Holland
59	RWS, Dir. Zuid-Holland
60	RWS, Dir. Zeeland
61	RWS, Dir. Noord-Brabant
62	RWS, Dir. Limburg
63	Depot van Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie
64	Bibliotheek RIZA
65	Hydrotheek
66	prof. dr. W. Seinen, RITOX-RUU
67	drs. J.Bol, RITOX-RUU
68	Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
69	ir. F. Langeweg
70	ir. A.H.M. Bresser
71	prof. dr. H.A.M. de Kruijf
72	dr. F.X.R. van Leeuwen
73	drs. J.H. Canton
74	ir. J.J.G. Kliet
75	dr. ir. A.H. Havelaar
76	dr. G.J.A. Speijers
77	ir. G.J. Heij
78	dr. L. van Liere
79	ir. J.F.M. Versteegh
80	drs. J.C. van der Vlugt
81	dr. G.M. van Dijk
82	dr. A. Veen
83	Hoofd Bureau Voorlichting en Public Relations
84-89	auteurs
90-91	Bibliotheek RIVM
92	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
93-120	Reserve exemplaren

VOORWOORD

In dit rapport zijn de resultaten weergegeven van een beperkt onderzoek naar de toxiciteit van cyanobacteriën in recreatiewateren. Het onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van Hoofdinspectie Volksgezondheid voor de Milieuhygiëne en kwam tot stand naar aanleiding van gezondheidsklachten van recreanten in diverse meren in het beheersgebied van het Hoogheemraadschap van Rijnland.

De toxiciteitstesten werden uitgevoerd door Drs. J. Bol van het Research Instituut Toxicologie van de Rijksuniversiteit Utrecht (RITOX). De fytoplanktongegevens werden verstrekt door medewerkers van het Hoogheemraadschap van Rijnland.

INHOUDSOPGAVE

Verzendlijst	ii
Voorwoord	iv
Inhoud	v
Summary/Samenvatting	vi
1. Inleiding	1
1.1. Soorten cyanotoxines	1
1.2. Detectiemethoden	1
1.3. Ecologische aspecten	2
1.4. Gezondheidsrisico's	2
1.5. Probleemstelling	3
2. Methoden	4
2.1. Bemonstering	4
2.2. Fytoplankton	4
2.3. Toxiciteitstest	4
3. Resultaten	5
4. Discussie	7
5. Conclusies	8
6. Aanbevelingen	9
7. Globaal onderzoeksvoorstel	10
8. Literatuur	11

SUMMARY

Nowadays, high numbers of cyanobacteria dominate Dutch inland surface waters. Several species of cyanobacteria have the property to produce toxins, causing poisoning of zooplankton, fish, birds and mammals, including man.

Increasing numbers of health problems after bathing in surface waters of bacteriologically good quality according to Dutch Standards were noticed in the past few years. Studies on phytoplankton composition indicated a relationship between incidents of health problems and cyanobacterial blooms. A peak in health complaints in the summer of 1994 prompted the national health authorities to assess cyanobacterial toxicity in seven lakes in the Rijnland Waterboard region.

Five samples were shown positive in the mouse bioassay. Based on the symptoms during the observation period and on pathological anatomy it was concluded that the poisoning was caused by hepatotoxins. The presence of *Microcystis aeruginosa* in all toxic samples suggests that this species was the major source of toxin production, although it cannot be excluded that the toxin partly originated from *Anabaena* species. In the two non-toxic samples the phytoplankton was dominated by *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena spiroides*, respectively, two potential toxin producers. The lack of toxic effect could be due to either low or total absence of toxin production in these strains.

At the observed toxicity levels it is highly unlikely, that humans will swallow a lethal dose of cyanotoxins while swimming. However, in cyanobacterial scums toxin concentrations may be many-fold higher. Furthermore, the hazardous effect of sublethal doses should be considered.

From this study it can only be concluded that a high coincidence was shown between the presence of toxic cyanobacteria and human health problems, since other causes cannot be excluded. Recommendations for future studies are focussed on a better assessment of the relationship between toxic cyanobacteria and health risks.

SAMENVATTING

De toenemende verrijking van zoet oppervlaktewater met voedingsstoffen heeft geleid tot een toename van de bijdrage van cyanobacteriën (blauwwieren) aan het totale fytoplankton. Verschillende soorten cyanobacteriën kunnen toxines produceren, die vergiftigingsverschijnselen kunnen veroorzaken bij zooplankton, vissen, vogels en zoogdieren, waaronder de mens.

Evenals in andere meren is binnen het beheersgebied van het Hoogheemraadschap van Rijnland de afgelopen jaren een toename geconstateerd van het aantal gezondheidsklachten na zwemmen in water van bacteriologisch goede kwaliteit. Resultaten van onderzoek naar de fytoplanktonsamenvatting gaven een indicatie, dat er een verband bestond tussen het voorkomen van cyanobacteriën en de gezondheidsklachten. Naar aanleiding van een piek in het aantal klachten werd in augustus 1994 éénmalig de toxiciteit getest van het fytoplankton van zeven verschillende meren door middel van bioassays met muizen.

Vijf van de zeven monsters bleken toxisch te zijn. Op grond van pathologische symptomen en pathologisch-anatomisch onderzoek werd geconcludeerd, dat hepatotoxines de dood van de muizen veroorzaakt hadden. Deze toxines leken in alle gevallen geassocieerd te zijn met de aanwezigheid van de cyanobacterie *Microcystis aeruginosa*, hoewel een bijdrage van *Anabaena* soorten niet uitgesloten kan worden. In de beide monsters, waarin geen toxines werden aangetoond, werd het fytoplankton gedomineerd door respectievelijk *Microcystis aeruginosa* en *Anabaena spiroides*, twee potentieel toxische soorten. Onduidelijk is of het uitblijven van toxische effecten het gevolg is van lage toxineconcentraties in de monsters of het volledig ontbreken van toxineproductie bij deze stammen.

Bij de gevonden toxiciteitsniveaus lijkt het ondenkbaar, dat mensen door te zwemmen in de onderzochte meren een lethale dosis binnen zouden krijgen; dat geldt echter alleen voor lokaties waar geen drijflagen voorkomen. Voorts moeten effecten van sublethale doses niet onderschat worden.

Op grond van deze resultaten kan niet geconcludeerd worden, dat de toxische cyanobacteriën daadwerkelijk de gezondheidsklachten veroorzaakt hebben. Daarom zijn aanbevelingen gedaan voor een gericht onderzoek naar de relatie tussen toxische cyanobacteriën en gezondheidsklachten van recreanten.

1. INLEIDING.

De toenemende verrijking van oppervlaktewater met voedingsstoffen heeft geleid tot een toename van de bijdrage van cyanobacteriën (blauwwieren) aan het totale fytoplankton. Verschillende soorten cyanobacteriën kunnen toxines produceren, die vergiftigingsverschijnselen kunnen veroorzaken bij zooplankton, vissen, vogels en zoogdieren, waaronder de mens (Kappers, 1987; NRA, 1990; Bol & Seinen, 1993; Aquasense, 1994).

1.1. Soorten cyanotoxines.

In de literatuur zijn verscheidene cyanotoxines beschreven, ze verschillen in chemische structuur en werkingsmechanisme. De namen van de toxines zijn vaak afgeleid van het organisme, dat ze produceert. Ze worden meestal ingedeeld naar werkingsmechanisme:

- Hepatotoxines komen het meest voor. Ze worden geproduceerd door stammen van *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* en *Nostoc*. Het zijn cyclische verbindingen opgebouwd uit 7 aminozuren met een molecuulgewicht van ca 1000. In vertebraten wordt in eerste instantie de lever aangetast. Er zijn verschillende varianten bekend, waarvan microcystin-LR de best onderzochte is. De LD50 bij intraperitoneale inspuiting van dit toxine bij muizen is ca 50 µg/kg lichaamsgewicht.
- Neurotoxines worden geproduceerd door soorten van *Anabaena*, *Aphanizomenon* en *Oscillatoria*. Het gaat hierbij om een verzameling stoffen met verschillende chemische structuur. In meeste gevallen is sprake van alkaloiden, die werkzaam zijn op het neuromusculaire systeem. Twee toxines van *Aphanizomenon* vertonen qua structuur sterke overeenkomst met toxines van mariene dinoflagellaten, die verantwoordelijk zijn voor paralytic shellfish poisoning (PSP). De structuur van anatoxin-a is analoog aan die van cocaine, terwijl anatoxin-a(s) een organofosforverbinding is. De LD50 bij intraperitoneale inspuiting bij muizen varieert van 10 tot 200 µg/kg.
- Dermatotoxines worden geproduceerd door uiteenlopende soorten cyanobacteriën, waaronder *Oscillatoria* spp. en *Lyngbya* spp. Hierbij gaat het om een zeer variabele groep van verbindingen. Vaak zijn het lipopolysacchariden, die in de slijmlaag van de organismen voorkomen. Deze verbindingen kunnen naast huidirritaties ook darmklachten veroorzaken. De bekende "swimmers itch" wordt veroorzaakt door *Lyngbya majuscula*. Dit organisme produceert twee toxines; lyngbyatoxine, een indolalkaloïde en debromoaplysiatoxine, een fenol. Beide laatstgenoemde verbindingen kunnen ook tumoren veroorzaken.

1.2. Detectiemethoden.

De meest gebruikte methode voor de detectie van cyanotoxines is intraperitoneale inspuiting in muizen. Daarnaast zijn andere methoden ontwikkeld c.q. in ontwikkeling variërend van bioassays met zoogdiercellen tot chemische analysetechnieken. De meest succesvolle methoden tot nu toe lijken: bioluminescentie assay (Microtox) (Volterra *et al.*, 1992), ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay)(Codd *et al.*, 1989) en HPLC (high performance liquid chromatography) (Bol, 1991; Lawton *et al.*, 1994). De eerstgenoemde techniek is voorsnog alleen getest voor microcystine-LR. ELISA is een snelle en simpele

methode voor detectie, maar laat geen kwantificering toe. Met HPLC kan daarentegen een breed scala aan toxines gedetecteerd en gekwantificeerd worden.

Voor anatoxines en microcystines zijn al geruime tijd HPLC analyses bekend. Bij RITOX Utrecht is onlangs een HPLC-methode ontwikkeld, waarbij anatoxines en microcystines in een enkele run bepaald kunnen worden. De microcystines kunnen echter, met uitzondering van microcystine-LR, niet geïdentificeerd worden, omdat standaarden in Nederland niet beschikbaar zijn. Dat betekent, dat HPLC nog steeds gecombineerd moet worden met dierproeven.

Voor de aphantoxines zijn nog helemaal geen analysemethoden bekend. Omdat in de Nederlandse oppervlaktewateren regelmatig bloeien van *Aphanizomenon*, de producent van aphantoxine, optreden zou de ontwikkeling van een analysemethode voor deze toxines geen overbodige luxe zijn. Temeer daar d.m.v. intraperitoneale injectie bij muizen aangetoond is dat ook toxische stammen van *Aphanizomenon* voorkomen (Plas Laagraven; De Bles, persoonlijke mededeling).

1.3. Ecologische aspecten.

Voor de ecologische aspecten wordt verwezen naar de rapporten van Bol & Seinen (1993) en Aquasense (1994).

1.4. Gezondheidsrisico's.

Mensen en landdieren kunnen op twee manieren in contact komen met toxische cyanobacteriën, hetzij door het drinken van water of door het zwemmen erin. In het geval van drinkwater moet opgemerkt worden, dat de meeste cyanotoxines bij de gangbare zuiveringsstappen niet weggevangen worden (Hoekstra, 1991). Uit onderzoek is wel gebleken, dat er niet of nauwelijks cyanobacteriën voorkomen in verzamelbekkens van duininfiltratiebedrijven (Versteegh & Van Dijk-Looyard, 1988). In drinkwaterspaarbekkens worden wel cyanobacteriën gevonden, waaronder potentieel toxische (Hoekstra, 1991). Bij het innamepunt Andijk is in 1994 ijzer gedoseerd om overlast door cyanobacteriën te beperken.

Bij het zwemmen in cyanobacterierijk water behoren vooral kinderen en dieren tot de risicogroepen. Kinderen zijn in het algemeen minder kieskeurig dan volwassenen met betrekking tot drijfslagen in het water. Bovendien krijgen zij in het vuur van het spel vaak meer water binnen dan volwassenen. Dieren hebben de gewoonte zich te likken na het zwemmen.

In het buitenland zijn veel gevallen bekend van ziekte bij of dodelijke slachtoffers onder huisdieren, vee en wild na consumptie van (water met) toxische cyanobacteriën (NRA, 1990; Done & Bain, 1993; Fitzgerald & Poppenga, 1993; Gunn *et al.*, 1992). In Nederland zijn dierlijke slachtoffers niet bekend. Dat kan echter het gevolg zijn van onbekendheid met het fenomeen cyanotoxinevergiftiging bij dieren- en veeartsen (Bol, persoonlijke mededeling).

De met cyanobacteriën geassocieerde klachten bij mensen lopen uiteen van gastro-intestinale klachten (misselijkheid, overgeven, buikpijn en diarree) tot griepachtige verschijnselen, hoofdpijn, oorpijn, keelpijn, blaren rond de mond en geïrriteerde ogen of

huid. In twee gevallen werd zelfs melding gemaakt van een ongewone vorm van longontsteking (NRA, 1990). Daarnaast zijn leverbeschadigingen beschreven na chronische blootstelling aan sublethale concentraties in drinkwater (Falconer *et al.*, 1983). Voor een uitgebreider overzicht van ziektebeelden en klachten wordt verwezen naar rapporten van Kappers (1987), NRA (1990) en Bol & Seinen (1993).

Veel gevallen van intoxicatie zijn bekend uit de Scandinavische landen, Engeland en Australië (NRA, 1990). In Nederland zijn ook enkele gevallen bekend van gezondheidsklachten geassocieerd met toxische cyanobacteriën. Het onderzoek naar de gezondheidsklachten van zwemmers in een Gelderse recreatieplas in de zomer van 1990 is daarvan het best gedocumenteerd. Bij dat onderzoek werd neurotoxiciteit aangetoond bij een dominantie van *Anabaena flos-aquae* (Woldman & van Brederode, 1991). In 1992 werden in de plas Laagraven in de Provincie Utrecht toxinen aangetoond tijdens een bloei van *Aphanizomenon flos-aquae* (De Bles, persoonlijke mededeling). In de Grote Plas van het Haarlemmermeerse Bos werden in de zomer van 1990 uitzonderlijk veel gastro-intestinale klachten geregistreerd van recreanten tijdens een bloei van *Anabaena spiroides* (Van der Veer, persoonlijke mededeling). In 1991 werden eveneens klachten van huidirritaties geregistreerd van recreanten in het Oosterduinmeer, waar op dat moment een bloei van *Gloeotrichia echinulata* heerste (Van der Does, persoonlijke mededeling). In beide laatste gevallen zijn echter geen toxinebepalingen uitgevoerd.

Kappers constateerde in 1987, dat er in Nederland nog maar weinig klachten verzameld waren. Het aantal klachten lijkt de laatste jaren toe te nemen. Of dat het gevolg is van een toenemende bewustwording of van een daadwerkelijke toename van het vóórkomen van toxische cyanobacteriën is niet duidelijk, omdat cyanobacterietoxiciteit in Nederland niet standaard wordt geregistreerd.

Bij een aantal andere Nederlandse onderzoeken naar cyanobacterietoxines in het kader van drinkwateronderzoek en oppervlaktewaterkwaliteitsonderzoek werd een relatief groot aantal toxische gevallen gescoord (Leeuwangh *et al.*, 1983; Bol & Seinen, 1988; Bol & Seinen, 1991; Aquasense, 1994). In deze gevallen is echter geen relatie met gezondheidsklachten te leggen.

1.5. Probleemstelling.

In de relatief warme zomer van 1994 hebben cyanobacteriebloeien weer tot grote zorgen bij de beheerders geleid. In een aantal gevallen werd het RIVM benaderd met vragen over een normstelling inzake deze problematiek. Normstelling ontbreekt echter. In een aantal gevallen zijn de beheerders zelf overgegaan tot het (laten) uitvoeren van extra cyanobacterietellingen en/of bepalingen van cyanobacterietoxines.

Ook binnen het beheersgebied van het Hoogheemraadschap van Rijnland is de afgelopen jaren een toename geconstateerd van het aantal gezondheidsklachten na zwemmen in water van bacteriologisch goede kwaliteit. Resultaten van onderzoek naar de fytoplanktonsaamenstelling gaven een indicatie, dat er een verband bestond tussen het voorkomen van cyanobacteriën en de gezondheidsklachten. Naar aanleiding hiervan is in augustus 1994 éénmalig de toxiciteit getest van het fytoplankton van 7 verschillende meren door middel van bioassays met muizen. Tevens werd globaal de fytoplanktonsaamenstelling bepaald.

Hier wordt gerapporteerd over de resultaten van deze screening. Daarnaast worden aanbevelingen gedaan voor verder onderzoek om tegemoet te komen aan hiaten in kennis en normstelling.

2. METHODEN

2.1. Bemonstering. De monsters werden genomen op 9 augustus 1994. Vanaf de oever werden oppervlaktewatermonsters genomen met behulp van een emmer. Voor het bemonsteren werd steeds een locatie uitgezocht waar geen drijfslagen van cyanobacteriën voorkwamen. Op deze manier werd voorkomen, dat, door eventueel hogere toxiciteitsniveaus in de drijfslagen, een scheefgetrokken beeld van de situatie zou ontstaan.

2.2. Fytoplankton. Voor de bepaling van de fytoplanktensamenstelling werden submonsters van 1 liter tot ca 6 ml geconcentreerd over 20 µm planktonnet. De geconcentreerde monsters werden gefixeerd met formaline. De drooggewichtbepalingen werden niet uitgevoerd op de monsterdatum, maar zijn ontleend aan routinegegevens van monsterdagen rond de monsterdatum. In een aantal gevallen zijn de drooggewichten afgeleid van de chlorofylgehaltenes (zie resultaten). Alle fytoplanktongegevens werden verstrekt door het Hoogheemraadschap van Rijnland.

2.3. Toxiciteitstest. Afhankelijk van de fytoplanktondichtheid werd een zodanige hoeveelheid water geconcentreerd over 20 µm planktonnet, dat een hooggeconcentreerde fytoplanktonslurrie ontstond. Dit materiaal werd gevriesdroogd en hiervan werd 10 mg, opgelost in 1 ml van een steriele 0.9% fysiologische zoutoplossing, intraperitoneaal ingespoten in muizen met een gemiddeld gewicht van 20 g. In geval van een duidelijk positieve respons werd tevens een tienmaal lagere dosis getest. Omdat het een eerste screening betrof en om het aantal proefdieren te beperken werden de bioassays in enkelvoud uitgevoerd. Eerder onderzoek heeft aangetoond, dat de muisbioassay voor cyanotoxines goed reproduceerbaar is (Bol, persoonlijke mededeling) Voor verdere details omtrent de muisbioassay wordt verwezen naar (Bol & Seinen, 1991). De muizen werden na toedienen gedurende 5.5 uur geobserveerd en de overlevingstijd na de injectie werd vastgesteld. De overlevende muizen werden na 5.5 uur gedood door middel van cervicale dislocatie. Van alle dieren werd het lichaamsgewicht en het gewicht van de lever bepaald. De toxiciteitstesten werden uitgevoerd door J. Bol van het Research Instituut Toxicologie (RITOX) RUU.

3. RESULTATEN

Van de zeven geteste monsters bleken vijf positief te zijn in de muisbioassay bij toediening van 10 mg fytoplankton (drooggewicht) (Tabel 1). Bij alle vijf monsters stierven de dieren binnen de observatieperiode van 5.5 uur en bleek hun relatieve levergewicht (RLW) flink toegenomen. Er lijkt een redelijk verband te bestaan tussen beide parameters; bij langere overlevingstijd is de toename van het RLW geringer. Dat indiceert, dat het toxische effect vooral veroorzaakt wordt door hepatotoxinen. Op grond van de waargenomen effecten kan geconcludeerd worden, dat er geen of slechts lage concentraties neurotoxines in de monsters aanwezig waren.

De resultaten met betrekking tot het fytoplankton zijn samengevat in Tabel 2. Van bijna alle waargenomen fytoplanktonsoorten is bekend, dat zij toxines kunnen produceren. Uitzonderingen zijn *Ceratium hirundinella* en *Aulacoseira* sp., beide geen cyanobacteriën. Soorten van het geslacht *Aphanizomenon* worden in de literatuur vooral beschreven als producenten van neurotoxines. Aangezien in deze bioassays geen effecten van neurotoxines waargenomen werden lijkt de aanwezigheid van *Aphanizomenon* niet van belang voor de interpretatie van de gegevens. Bij *Gloeotrichia echinulata* zijn tot nu toe alleen dermatotoxines aangetoond (D'Hont *et al.*, 1991); hepatotoxische effecten zijn voor deze soort niet beschreven.

Tabel 1. Overlevingstijd (OT) en relatief levergewicht (RLW) van muizen na intraperitoneale toediening van cyanobacterieconcentraten. Tevens is de toename van het relatief levergewicht ten opzichte van dat van niet belaste muizen weergegeven (RLW+).

Monsterplaats	Code HHR	OT (h.min)	RLW ¹⁾ %	RLW+ ²⁾ %
Joppe	RO355	2.29	7.6	69
Braassemermeer	RO272	2.38	7.0	56
Zegerplas	RO373	2.54	7.4	64
Broekvelden-Vettenbroek	ROP01803	4.06	6.4	42
Oosterduinmeer	RO374	4.18	5.5	22
Langerarse Plas	ROP09539	e	4.6	-
Gr. Plas Haarlemmermeerse Bos	ROP18046	e	4.4	-

¹⁾ het relatief levergewicht is het levergewicht als percentage van het totaal lichaamsgewicht

²⁾ de toename van het RLW is berekend op basis van een RLW van 4.5

e euthanasie na ongeveer 5.5 uur

Tabel 2. Drooggewicht (DW) en globale fytoplanktonsamenstelling op de verschillende monsterpunten. De drooggewichten zijn niet van dezelfde monsterdata als de bepalingen van toxiciteit en fytoplanktonsamenstelling, maar van een tijdstip rond de monsterdatum. *) Drooggewichten berekend uit chlorofylgehalten volgens DW = 250 x chl.

Monsterplaats	Code HHR	DW (mg/l)	M.a	A.s	A.sp	Apha	G.e	Rest
Joppe	RO355	14	A					
Braassemermeer	RO272	14	cc			+		c ¹
Zegerplas	RO373	9	cc	c		+		r ²
Broekvelden-Vettenbroek	ROP01803	3*	c				c	+ ²
Oosterduinmeer	RO374	25*	++		c	+		++ ³
Langeraarse Plas	ROP09539	75*	A	c		+		
Gr. Plas Haarlemmermeerse Bos	ROP18046	36*	r	A		+		

M.a *Microcystis aeruginosa*

A.s *Anabaena spiroides*

A.sp *Anabaena* sp.

Apha *Aphanizomenon flos-aquae*

G.e *Gloeotrichia echinulata*

¹⁾ *Aulacoseira* sp.

²⁾ *Ceratium hirundinella*

³⁾ *Lyngbya* sp.

A dominant

cc zeer veel

c veel

++ redelijk veel

+ weinig

r zeer weinig

Microcystis komt voor in alle toxische monsters. Van soorten van dit geslacht is aangetoond, dat zij hepatotoxines produceren (NRA, 1990). Opmerkelijk is de relatie tussen de mate van toxiciteit en de abundantie van *Microcystis*. Daaruit kan echter niet zonder meer geconcludeerd worden, dat *Microcystis* de enige veroorzaker van de toxische effecten geweest zal zijn, aangezien *Anabaena*-soorten ook hepatotoxines kunnen vormen. Soorten van dit geslacht kwamen echter in veel kleinere aantallen in de monsters voor. Voor een verdere identificatie en kwantificering van de aanwezige toxines zal gebruik gemaakt moeten worden van HPLC.

Uit de testen met materiaal van de Langeraarse Plas en de Grote Plas van het Haarlemmermeerse Bos komt duidelijk naar voren, dat een hoge abundantie van *Microcystis aeruginosa* of *Anabaena spiroides* niet automatisch hoeft te leiden tot hepatotoxische effecten in de muisbioassay. Op grond daarvan kan echter niet zonder meer geconcludeerd worden, dat er geen toxines in de monsters aanwezig waren. Bij eerder onderzoek van het RITOX werden cyanotoxines aangetoond met behulp van HPLC, terwijl deze toxines in de muisbioassay geen effect hadden (Aquasense, 1994).

Opmerkelijk is het optreden van gezondheidsklachten in Broekvelden-Vettenbroek. Ten eerste was de toxiciteit per eenheid drooggewicht niet erg hoog in deze plas (Tabel 1). Bovendien was de biomassa (DW) in deze plas erg laag vergeleken bij die van de andere plassen en was de bijdrage van potentieel toxische cyanobacteriën aan het totale fytoplankton relatief laag (Tabel 2). Deze resultaten suggereren, dat er geen relatie bestaat tussen het gehalte potentieel toxische cyanobacteriën in het water en het optreden van gezondheidsklachten. Het is echter onbekend of in dit geval de aard en/of de frequentie van de klachten anders was dan bij de andere lokaties.

4. DISCUSSIE

Uit de screening is gebleken, dat op vijf van de zeven lokaties toxische cyanobacteriën voorkomen. Dat kan een onderschatting zijn, omdat de muisbioassay een relatief ongevoelige bepaling is (G.A. Codd, persoonlijke mededeling; Aquasense, 1994). Het kan echter ook betekenen, dat er in twee gevallen inderdaad sprake was van een niet-toxische cyanobacteriebloei.

Onvoorspelbaar optreden van toxineproductie door cyanobacteriën kan twee oorzaken hebben. Ten eerste zijn er stammen van potentieel toxische soorten, die nooit toxines produceren. Dit lijkt er op te wijzen, dat het vermogen om toxines te produceren genetisch vastgelegd is (Volterra, 1993). Daarnaast vormen de stammen, die wel toxines kunnen produceren deze niet het hele jaar door (Carmichael *et al.*, 1977). Uit veld- en laboratoriumonderzoek is gebleken, dat de meeste abiotische factoren in meer of mindere mate invloed hebben op de mate van toxineproductie (Bol & Seinen, 1993; Annadotter *et al.*, 1993; Aquasense, 1994).

Het kan op grond van deze experimenten niet uitgesloten worden, dat andere dan de hepatotoxische verbindingen (mede) een rol hebben gespeeld bij het veroorzaken van de gezondheidsklachten van de recreanten, temeer daar in twee van de zeven gevallen geen toxines werden aangetoond, terwijl er wel sprake was van klachten. In dat geval kan gedacht worden aan lipopolysacchariden en dermatotoxines (D'Hont *et al.*, 1991; NRA, 1990). Het is onduidelijk of het in alle gevallen om hetzelfde type klachten ging.

Het is ook nog mogelijk, dat de gezondheidsklachten door andere bacteriën of virussen veroorzaakt werden, hoewel het water bij routinemetingen was beoordeeld als "van bacteriologische goede kwaliteit" (Van der Veer, persoonlijke mededeling). Bij dit type routinebepalingen wordt echter slechts op een deel van de aanwezige bacteriesoorten gescreend.

Wel mag aangenomen worden, dat de hepatotoxines inderdaad afkomstig zijn van cyanobacteriën, omdat andere bacteriën en virussen door de voorbehandeling van de monsters (filtratie over een planktonnet) niet in de uiteindelijk toegediende preparaten achtergebleven zullen zijn, tenzij ze gebonden waren aan grotere deeltjes. Definitief uitsluitsel over de aard van de hepatotoxines kan echter alleen verkregen worden door verdere analyse, bijvoorbeeld met HPLC.

De hoge score van het aantal monsters met toxische eigenschappen (vijf uit zeven) is vergelijkbaar met die van onderzoeken door de National Rivers Authority (NRA) en RIZA. NRA (1990) rapporteert, dat bij een onderzoek aan 79 meren met potentieel toxische cyanobacteriën in 53 gevallen toxiciteit werd aangetoond (67%). In 1992 deed het RITOX in opdracht van RIZA onderzoek aan fytoplanktonmonsters van 26 verschillende meren. Bij 22 van de 28 monsters werden toxische effecten gevonden in de muis-bioassay (79%). HPLC-analyses bevestigden in de meeste gevallen de aanwezigheid van toxines (-Aquasense, 1994). De resultaten van de beide Nederlandse onderzoeken lijken erop te wijzen, dat cyanotoxines alleen voorkomen tijdens relatief warme zomers. Annadotter *et al.* (1993) rapporteren echter ook de aanwezigheid van cyanotoxines bij temperaturen lager dan 10 °C.

De risico's voor de mens zijn op grond van deze screening nauwelijks in te schatten. Rechtstreekse omrekening van de sublethale en lethale dosis voor muizen (respectievelijk 50 en 500 mg/kg) naar de mens (60 kg) levert 3 en 30 g cyanobacteriën (drooggewicht) op. Bij een drooggewicht van 15 mg/l komt dat neer op 200 en 2000 liter water. Bovendien wordt de lethale dosis bij orale toediening een factor 50 hoger geschat vergeleken bij intraperitoneale toediening (Kappers, 1987). Het lijkt dus ondenkbaar, dat een mens door te zwemmen in de desbetreffende meren een lethale dosis binnen zou krijgen. Dat geldt echter alleen voor de lokaties waar geen drijfslagen voorkomen (zie Methoden). In drijfslagen kan het gehalte aan cyanobacteriën wel 1000 maal hoger zijn (Ibelings & Mur, 1992).

Effecten van blootstelling aan sublethale doses moeten echter niet onderschat worden. Er zijn in elk geval aanwijzingen, dat sublethale doses van cyanotoxines in drinkwater leverbeschadigingen bij mensen kunnen veroorzaken (Falconer *et al.*, 1983). In experimenten met proefdieren werd tevens de mutagene werkingen van cyanotoxines aangetoond (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992). Varkens vormen een veel beter modelsysteem voor risicoschattingen van toxische stoffen voor de mens (Speijers, persoonlijke mededeling). Falconer *et al.* (1994) berekenden aan de hand van experimenten met varkens en na verrekening met een aantal onzekerheidsfactoren een maximaal toelaatbare dosis (gebaseerd op een no effect level) voor drinkwater van 1 µg toxine/l, hetgeen in dat geval overeenkwam met een *Microcystis*-gehalte van 5000 cellen/ml. Een dergelijk celaantal is niet ongevoelbaar, vooral niet in het geval van drijfslagen.

5. CONCLUSIES.

Uit dit summiere onderzoek kan geconcludeerd worden, dat in vijf van de zeven meren, waar gezondheidsklachten optraden, toxische cyanobacteriën voorkwamen.

Het bewijs, dat de klachten veroorzaakt werden door de hepatotoxische stoffen uit de cyanobacteriën kan in dit soort onderzoek niet waterdicht aangetoond worden. Het is heel goed mogelijk, dat de gezondheidsklachten (mede) veroorzaakt werden door andere verbindingen dan de hepatotoxines, temeer daar in twee van de zeven gevallen geen toxines werden aangetoond, terwijl er wel sprake was van klachten.

Het leggen van een verband tussen het voorkomen van toxische cyanobacteriën en gezondheidsklachten wordt verder bemoeilijkt door gebrek aan informatie over de aard en de frequentie van de klachten.

Het kan niet uitgesloten worden, dat de gezondheidsklachten door andere bacteriën of virussen veroorzaakt werden, hoewel het water bij routinemetingen was beoordeeld als "van bacteriologische goede kwaliteit" (Van der Veer, persoonlijke mededeling).

De in dit onderzoek aangetoonde toxiciteitsniveaus lijken niet lethaal te zijn voor zwemmers. In water met grote aantallen potentieel toxische cyanobacteriën - en vooral daar waar zich drijfslagen gevormd hebben - moet zwemmen echter afgeraden worden zolang de kans op sublethale effecten niet uitgesloten kan worden.

6. AANBEVELINGEN.

Wanneer de resultaten van dit onderzoek gevoegd worden bij de resultaten uit de eerder genoemde Nederlandse onderzoeken lijkt het aanbevelenswaardig meer aandacht te besteden aan de toenemende problematiek rond de toxische cyanobacteriën. Hierin lijkt zeker een rol weggelegd voor het RIVM met betrekking tot de humaan toxicologische vraagstellingen en een eventuele normstelling. Vanuit ecologisch oogpunt is verder onderzoek ook van belang voor meren zonder een directe recreatiefunctie.

Er zijn geen maatregelen bekend om specifiek de toxische cyanobacteriën terug te dringen; daarvoor kunnen alleen de algemene maatregelen voor het beperken van fytoplanktongroei toegepast worden (Anonymus, 1993). Het lijkt dan ook zinvol het ingezette beleid te vervolgen en waar nodig te verscherpen. Lokaal kan de waterkwaliteit mogelijk verbeterd worden door het nemen van additionele maatregelen, zoals doorspoelen, baggeren, actief biologisch beheer etc.

Zoals door Kappers (1987) al gesteld werd is het moeilijk normen te formuleren door het onvoorspelbare optreden van toxische cyanobacteriebloeien. Dit is echter ten dele te wijten aan het retrospectieve karakter van het onderzoek, dat tot nu toe plaats vond in Nederland (en veelal ook in het buitenland). Ook in dit geval werd pas een onderzoek ingesteld naar de toxiciteit van de cyanobacteriën op het moment, dat er sprake was van gezondheidsklachten. Het is daarom onbekend of toxische cyanobacteriën ook kunnen voorkomen zonder dat hun aanwezigheid tot gezondheidsklachten leidt. Daarnaast is het onduidelijk of er een relatie bestaat tussen bepaalde cyanotoxines of cyanobacteriën en bepaalde gezondheidsklachten. Nader onderzoek zal hierin duidelijkheid moeten brengen.

Een onderzoek zou er allereerst op gericht moeten zijn om een ondubbelzinnige relatie tussen de gezondheidsklachten en toxische cyanobacteriën aan te tonen. Daarbij zou speciale aandacht besteed moeten worden aan de relatie tussen de aard van de klachten en de aard van de cyanobacteriën.

Indien de relatie tussen gezondheidsklachten en cyanobacteriën aangetoond is, dan zou toch - mede gezien de vele vragen hierover, die elke warme zomer het RIVM bereiken - gestreefd moeten worden naar de formulering van hetzij een norm, hetzij een aanbeveling

hoe te handelen met betrekking tot toxische cyanobacteriën. Mogelijk kan een gefaseerde normering opgesteld worden, waarbij pas overgegaan wordt tot de bepaling van de toxiciteit wanneer het gehalte aan toxische cyanobacteriën een zekere grens overschrijdt. Het inventariserende onderzoek moet daarom ook gericht zijn op de opheldering van de relatie tussen het gehalte toxische cyanobacteriën, de mate van toxiciteit en de gezondheidsklachten.

7. GLOBAAL ONDERZOEKSVORSTEL

Om een goede inschatting te kunnen maken van de problematiek moet in eerste instantie een inventarisatie gemaakt worden van de meren, waarin (potentieel) toxische cyanobacteriën voorkomen. Deze inventarisatie moet niet alleen meren omvatten, waar zich in het verleden problemen hebben voorgedaan, maar ook meren met potentieel toxische cyanobacteriën, waarvan geen klachten bekend zijn. Wanneer zo'n inventarisatie zich uitstrekt over meerdere jaren, kan antwoord verkregen worden op de vraag of het optreden van toxische cyanobacteriebloeien toeneemt (of misschien wel afneemt). Speciale aandacht moet besteed worden aan de soortsaamenstelling van de cyanobacteriën, het gehalte potentieel toxische cyanobacteriën en het toxiciteitsniveau.

Om inzicht te krijgen in de relatie tussen de aanwezigheid van al dan niet toxische cyanobacteriën en gezondheidsklachten moet tegelijkertijd bij waterbeheerders, recreatieschappen, artsen, GG&GD's, gezondheidscentra etc. een goede registratie van de aard en de ernst van de gezondheidsklachten plaatsvinden. Formulieren voor een dergelijk onderzoek zijn al opgesteld door het RIVM-LWL. Dit onderzoek moet vergezeld gaan van een screening op andere potentiële ziekteverwekkers. (Deze laatste gegevens worden voor recreatiewateren in sommige gevallen al verzameld bij hoge recreatiedruk.)

Op grond van de resultaten van het inventariserend onderzoek kan een vervolgonderzoek geformuleerd worden, waarin bijvoorbeeld aandacht besteed wordt aan verbetering van methoden om cyanotoxines te detecteren, andere methoden om toxische cyanobacteriën te detecteren, de humaan-toxicologische effecten van acute en chronische blootstelling aan cyanotoxines, ecologische effecten van cyanotoxines, etc.

Een gedetailleerd onderzoeksvoorstel zal opgesteld worden na overleg met vertegenwoordigers van inspecties van de volksgezondheid, RIMH's, (hoog)heemraad- en waterschappen, provincies, RIZA, RIVM, etc. Waar nodig zullen specialisten benaderd worden. Aangezien de problematiek van de toxische cyanobacteriën ook onderwerp van onderzoek is (geweest) bij instituten op het gebied van drinkwater en ecologisch onderzoek lijkt het zinvol vertegenwoordigers daarvan ook bij het overleg te betrekken.

8. LITERATUUR.

Annadotter, H., Cronberg, G. & Jönsson, L. - 1993 - The toxicity of blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Finjasjön, Sweden in relation to environmental factors - A five year study. Proceedings of the 5th international conference on the conservation and management of lakes, 239-244.

Anonymus - 1993 - Derde nota waterhuishouding: Ontwerp evaluatienota water 1993, aanvullende beleidsmaatregelen en financiering 1994-1998. pp. 179.

Aquasense - 1994 - Toxinen in cyanobacteriën; de situatie in Nederland. In opdracht van Rijkswaterstaat-RIZA. Rapport 94.0583, in prep.

Bol, J. - 1991 - De vorming van toxinen door cyanobacteriën. In: (W. Seinen & J. Bol (eds), Cyanobacteriën in Nederland een gezondheidsrisico!?, 30-36.

Bol, J. & Seinen, W. - 1988 - Een laboratoriumonderzoek naar de toxiciteit van *Microcystis aeruginosa* uit de Andelse Maas. Rapport VVFFT, Rijksuniversiteit Utrecht, pp 33.

Bol, J. & Seinen, W. - 1991 - De toxiciteit van *Microcystis aeruginosa* in het door de Provinciale Waterleiding Noord-Holland ten behoeve van de drinkwaterproductie ingenomen oppervlaktewater. Rapport RITOX, Rijksuniversiteit Utrecht, pp 18.

Bol, J. & Seinen, W. - 1993 - Toxineproducerende algen in Nederlandse oppervlaktewateren. Rapport RITOX, Rijksuniversiteit Utrecht, pp 56.

Codd, G.A., Brooks, P.W., Priestly, I.M., Poon, G.K., Bell, S.G. & Fawell, J.K. - 1989 - Production, detection and quantification of cyanobacterial toxins. Toxic. Assess. 4: 499-511.

D'Hont, D., De Pauw, N. & Van Hoof, F. - 1991 - Toxineproducerende algen, een reeel probleem. Water 56: 19-22.

Done, S.H. & Bain, M. - 1993 - Hepatic necrosis in sheep associated with ingestion of blue-green algae. Veterinary Rec. 133: 600.

Falconer, I.R., Beresford, A.M. & Runnegar, M.T.C. - 1983 - Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Med. J. Austr. 1: 511-514.

Falconer, I.R., Burch, M.D., Steffensen, D.A., Choice, M. & Coverdale O.R. - 1994 - Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. Environ. Tox. Water Qual. 9: 131-139.

Fitzgerald, S.D. & Poppenga, R.H. - 1993 - Toxicosis due to microcystin hepatotoxins in three Holstein heifers. J. Vet. Diagnost. Invest. 5: 651-653.

Gunn, G.J., Rafferty, A.G., Rafferty, G.C., Cockburn, N., Edwards, C., Beattie, K.A., Codd, G.A. - 1992 - Fatal canine neurotoxicosis attributed to blue-green algae (cyanobacteria). Veterinary Rec. 130: 301-302.

Hoekstra, A.C. - 1991 - Drinkwaterproductie in Nederland en cyanobacteriën. In: (W. Seinen & J. Bol (eds), Cyanobacteriën in Nederland een gezondheidsrisico!?, 24-29.

Ibelings, B.W. & Mur, L.R. - 1992 - Microprofiles of photosynthesis and oxygen concentration in *Microcystis* scums. FEMS Microbiol. Ecol. 86: 195-202.

Kappers, F.I. - 1987 - Effecten van cyanobacteriën (blauwwieren) op de gezondheid van recreanten. RIVM rapport nr. 148701001, pp 25.

- Lawton, L.A., Edwards, C. & Codd, G.A. - 1994 - Extraction and high performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525-1530.
- Leeuwangh, P., Kappers, F.I., Dekker, M. & Koerselman, W. - 1983 - Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. *Aqua. Tox.* 4: 63-72.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Otha, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W. & Fujiki, H. - 1992 - Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Canc. Res. Clinic. Oncol.*: 118:420-424.
- NRA - 1990 - Toxic blue-green algae. Report Natinal Rivers Authority, pp 125.
- Versteegh J.F.M. & Van Dijk-Looyard, A.M. - 1988 - Blauwwieren in het water van de open verzamelbekkens bij enkele duinfiltratiebedrijven. RIVM rapport nr. 718615001, pp 15.
- Volterra, L. - 1993 - Algal toxicity. In: G. Giusani & C. Gallieri (eds), *Strategies for lake ecosystems beyond 2000. Proceedings of the 5th international conference on the conservation and management of lakes*, 306.
- Woldman J.R. & van Brederode N.E. - 1991 - Gezondheidsklachten door cyanobacteriën? Een voorbeeld uit de praktijk. In: (W. Seinen & J. Bol (eds), *Cyanobacteriën in Nederland een gezondheidsrisico!?*, 13-21.