

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

STOWA

2009
21B

ISBN 978.90.5773.441.0



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 2009-21B
ISBN 978.90.5773.441.0

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!

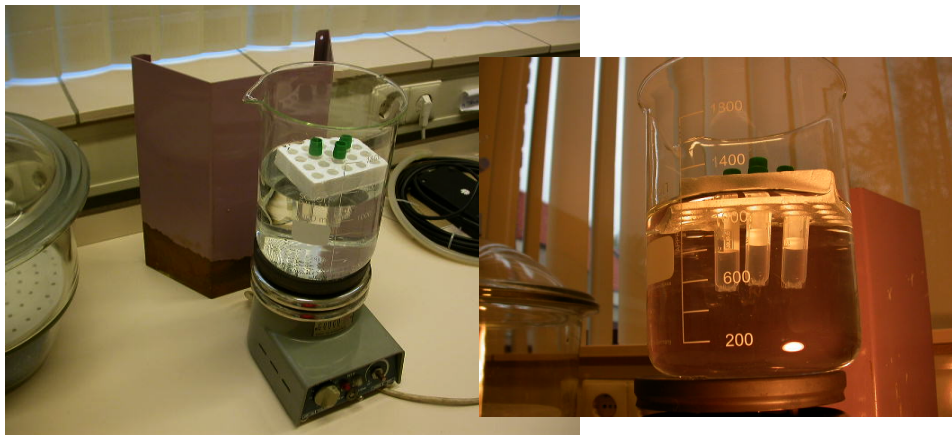
EXTRACTIE

- Een 2 L bekerglas 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 $< 1.6 \mu\text{g/L}$) 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 bekglas 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 ($0.1-1.6 \mu\text{g/L}$). 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 $40 \mu\text{g}$ microcystine/L gemeten, zodat kan worden gecontroleerd of de normen voor waarschuwing ($10 \mu\text{g/L}$) of zwemverbod ($20 \mu\text{g/L}$) 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 injectiespuit 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.