

LAXA 217

Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Rijkswaterstaat

Microcystines in het Volkerak- Zoommeer en hun mogelijke rol in de vogelsterfte



Strand bij Ooltgensplaat, augustus 2003

Kirsten Wolfstein, RIZA-WSE

December 2003

Ministerie van Verkeer en Waterstaat

Rijkswaterstaat

Dankwoord

Aan dit document hebben verschillende personen meegewerkt, die ik bij deze voor hun inzet wil bedanken:
Colinda Boender-Daane (WSE), Gerard Stroomberg (IMLO) en Arnold Veen (IMLB) voor hun bijdrage bij de discussie van de resultaten en het schrijven van dit rapport.

Kirsten Wolfstein

Inhoudsopgave

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Samenvatting | 4 |
| 2 | Inleiding | 6 |
| 2.1 | Cyanobacteriën en cyanobacterietoxines | 6 |
| 2.2 | Aanleiding onderzoek | 8 |
| 3 | Methode | 10 |
| 4 | Resultaten | 11 |
| 4.1 | Het Volkerak-Zoommeer | 11 |
| 5 | Discussie en conclusies | 15 |
| 5.1 | Vogelsterfte Oostvaardersplassen | 16 |
| 5.2 | IJsselmeerstudie | 18 |
| 5.3 | Relevantie voor visetende vogels | 20 |
| 5.4 | Hoe erg zijn de effecten uiteindelijk? | 21 |
| 6 | Literatuur | 23 |

1 Samenvatting

- In de afgelopen jaren kwam het in veel Nederlandse meren en plassen regelmatig tot een bloei en/of optreden van drijflagen van (toxische) cyanobacteriën. Deze veroorzaakte een belemmering in het gebruik van de verschillende functies van het meer. Verder werd sterfte van vissen (b.v. IJsselmeer 1995) en vogels (b.v. Volkerak-Zoommeer 2002) gerapporteerd, wat de vraag naar een mogelijk samenhang tussen de sterfte en de cyanobacteriënbloei opriep.
- Het projectplan was een ecologisch monitoring van cyanotoxines in fytoplankton, vissen en vogels in het Volkerak-Zoommeer (VZM). Het plan kon niet worden uitgevoerd, want in het VZM werden in 2003 geen dode vogels of vissen gevonden. In de Oostvaardersplassen vond in 2003 wel massale vogelsterfte plaats. Daar werden in het kader van een ander project dode en stervende vogels verzameld en geanalyseerd op botulisme, microcystinegehaltenes en histologische afwijkingen van de lever.
- Het fytoplankton van het Volkerak-Zoommeer werd in september 2003 gedomineerd door *Microcystis* sp.. In de drijflagen werd maximaal 5990 µg MC-equivalenten/l gemeten (Oude Tonge).
- De stervende vogels uit de Oostvaardersplassen toonden verlamingsverschijnselen, wat een gevolg van botulisme of van een vergiftiging door een ander soort cyanotoxine – het neurotoxine “anatoxine”- kan zijn, een gif dat b.v. door *Anabaena flos-aquae* wordt geproduceerd. Een combinatie van beide toxines zou misschien aan de dood kunnen hebben bijgedragen want de aanwezigheid van een sublethale dosis microcystine zou de toxiciteit van anatoxine kunnen versterken (Chorus et al. in Chorus 2001). Het gif kon worden aangetoond in een drijfslag van *Anabaena flos-aquae* in de dichtbij gelegen plas “Bovenwater”. De toxineanalyse is uitgevoerd door dr. A. Furey van de universiteit van Corke (Ierland).
- In de afgelopen jaren vonden steeds meer methodieke ontwikkelingen plaats, die zeer relevant zijn voor de studie van microcystine in het voedselweb. Meestal werd de standaard HPLC analyse ingezet na extractie van de microcystines in methanol (MeOH). Deze methode is nog steeds de standaard meettechniek voor microcystines in fytoplankton, maar levert problemen op bij de analyse van dierlijk weefsel. Voor toekomstig onderzoek aan microcystines in biota is het gebruik van LC-MS aan te bevelen.
- Er kan momenteel echter geen duidelijk uitspraak over de oorzaak van de vogelsterfte worden gedaan. De sterfte onder eenden in de Oostvaardersplassen was gerelateerd aan ernstige verlamingsverschijnselen die veelal ten onrechte worden toegeschreven aan botulisme.
Negatieve effecten van microcystine op aquatische organismen konden worden aangetoond in de IJsselmeerstudie, maar een direct verband tussen microcystinegehaltenes en mogelijk

schadelijke effecten bij diverse organismen ontbreekt (resultaten IJsselmeerstudie en mankerende ruimte- of tijdelijke verbinding in het Eemmeer 2003). Het feit, dat er deels zeer hoge microcystineconcentraties in vogellevers werden geanalyseerd, leidt tot de conclusie dat microcystines een van de factoren zijn, die bijdragen aan de sterfte. Als er zowel microcystine en anatoxine voorkomen, lijkt de toxiciteit en de schade nog groter te zijn. Al in al is er een sterke aanwijzing dat cyanotoxines een bijdrage hebben geleverd aan de sterfte van de vogels. Acute sterfte als gevolg van microcystine treedt alleen op bij zeer hoge dosis. Sterfte op lange termijn is niet direct meetbaar.

- **Aanbeveling:** Anatoxine werd voor het eerst aangetoond in Nederland. De verdere ontwikkeling van een analysemethode voor cyanotoxines (verschillende MC-typen en anatoxine) is een belangrijke taak voor het begrijpen van de effecten aan deze toxines in het voedselweb. Daarnaast is het inventariseren en karakteriseren van wateren met blauwalgenproblemen, het in kaart brengen van de probleem-veroorzakende blauwalgensoorten en het opzetten van een landelijke centraal meld- en informatiepunt voor waterbeheerders belangrijk.

2 Inleiding

Veel van de Nederlandse wateren zijn geëutrofiëerd, wat heeft geleid tot een sterke bloei van fytoplankton en met name cyanobacteriën. In de afgelopen jaren kwam het in veel meren en plassen regelmatig tot een bloei en/of optreden van drijfslagen van (toxische) cyanobacteriën. Dit veroorzaakte een belemmering in het gebruik van de verschillende functies van het meer (b.v. uitspraak van zwemverboden en overlast door stank in het Volkerak-Zoommeer bij Ooltgensplaat). Verder werd sterfte van vissen (b.v. IJsselmeer 1995) en vogels (b.v. Volkerak-Zoommeer 2002) gerapporteerd, wat de vraag naar een mogelijke relatie opriep.

Uit een literatuurstudie en een worst-case berekening naar de potentiële effecten van toxische cyanobacteriën op aquatische ecosystemen bleek dat cyanobacteriën of hun toxines mogelijk een risico vormen voor hogere trofische niveaus (AquaSense 1996). Tot op heden is de specifieke rol van cyanobacteriën en hun toxines in het bijzonder bij de sterfte van vissen en vogels onduidelijk.

De vroegtijdige dood van vis kan verschillende oorzaken hebben, zoals zuurstoftekort, te hoge watertemperatuur of pH waarde (bij hoge pH waarde wordt NH_4 omgezet tot NH_3 wat toxisch is voor vissen), verder parasieten en cyanotoxines. Sinds 1996 is er onderzoek gaande naar de ecologische effecten van (toxische) cyanobacteriën in het IJsselmeer (AquaSense 2002a & b, Wolfstein 2004 in prep.). In het project werd ondermeer gekeken naar de effecten van cyanotoxines (microcystines, MC's) op verschillende soorten vis.

Bij vogels ging men meestal uit van botulisme als doodsoorzaak. Het is niet eenvoudig om te bewijzen dat de toxines de doodsoorzaak van de vogels waren omdat er geen "effect-levels" voor microcystines in levers van vogels bekend zijn. Dat wil zeggen dat je aan de hand van toxineconcentraties in levers niet direct kunt zeggen of er schadelijke effecten te verwachten zijn.

2.1 Cyanobacteriën en cyanotoxines

Cyanobacteriën (blauwalgen, blauwwieren) horen tot de oudste organismen op aarde en komen overal ter wereld voor. Als ze in kleine hoeveelheden in het water voorkomen, vormen cyanobacteriën geen probleem. Pas als er een massale groei optreedt - algenbloei genoemd - zorgen ze voor overlast. Cyanobacteriën komen het hele jaar in het water voor met doorgaans een piek in de (na)zomer. Sommige soorten overwinteren in een vegetatieve staat door de vorming van sporen en vormen aldus een soort 'zaadbank'. In het voorjaar zorgt de kieming van de sporen vanaf het sediment voor de ontwikkeling van een nieuwe populatie. Een juiste combinatie van temperatuur (20 - 30 °C), licht en nutriënten plus een stabiele waterkolom kan leiden tot massale groei. Daarom vindt de ontwikkeling van cyanobacteriën of de vorming van drijfslagen meestal plaats vanaf juli, en maxima worden gevonden in

augustus en september. Een drijfslag is een verhoogde concentratie van cellen aan de wateroppervlakte, en ontstaat doordat sommige soorten cyanobacteriën zoals *Microcystis* in staat zijn om bij gunstige weersomstandigheden in de waterkolom te migreren door de aanwezigheid van gasvacuolen in de cellen. Drijfslagen kunnen zich ophopen aan de oevers van een meer, op stranden, achter vooroevers en in jachthavens.

Sommige cyanobacteriëngeslachten zijn in staat tot productie van toxines (tabel 1) zoals

- neurotoxines (anatoxine, saxitoxine) die aangrijpen op de overdracht van zenuwpulsen naar de spiervezels,
- hepatotoxines (microcystine, nodularine, cylindrospermopsine) die de eiwitfosfatase remmen (Chorus & Bartram 1999).
- lipopolysaccharides (LPS) die o.a. voorkomen op de celwand van (cyano)bacteriën en remmend werken op detoxicatie van microcystines (Best et al. 2002).

Er zijn meer dan 60 verschillende typen van microcystines geïdentificeerd, van wie microcystine-LR als een van de meest toxische typen is beschreven (Chorus & Bartram 1999). Microcystine is vooral intracellulair aanwezig en wordt niet of nauwelijks actief uitgescheiden.

Tabel 1. Potentieel toxische cyanobacteriënsoorten en door hen geproduceerde toxines

| Soort | Toxine |
|---|-----------------------------------|
| <i>Anabaena flos-aquae</i> , <i>A. circinalis</i> , <i>A. lemmermanii</i> , <i>A. spiroides</i> | Microcystine, Anatoxine |
| <i>Anabaenopsis</i> sp. | Microcystine |
| <i>Aphanizomenon</i> sp. | Cylindrospermopsine, Microcystine |
| <i>Cylindrospermum</i> sp. | Anatoxine |
| <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> | Cylindrospermopsine, Saxitoxine |
| <i>Gloeotrichia echinulata</i> | Microcystine |
| <i>Lyngbya</i> sp. | Saxitoxine |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> , <i>M. flos-aquae</i> , <i>M. wesenbergii</i> | Microcystine |
| <i>Nodularia spumigena</i> | Nodularine |
| <i>Nostoc</i> sp. | Microcystine |
| <i>Oscillatoria limosa</i> | Microcystine |
| <i>Planktothrix agardhii</i> , <i>P. formosa</i> , <i>P. mougeotii</i> , <i>P. rubescens</i> | Microcystine, Anatoxine |

Om überhaupt effect te hebben moeten microcystines eerst worden opgenomen door het inslikken van water – en fytoplankton, of het eten van fytoplankton door bijvoorbeeld zoöplankton of mosselen. Via deze route kunnen de toxines terecht komen in vissen of vogels. Sommige cyanobacteriën zijn door hun vorm (kolonies of filamenten) en afmeting slecht begraasbaar. Indien de cyanobacteriën niet of nauwelijks worden gegeten zal microcystine dus ook niet doordringen in het voedselweb. Gevolgen van de opname van toxines voor verschillende organismen kunnen zijn:

- Behalve dat met name kolonie- en draadvormende cyanobacteriën (*Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*) minder goed kunnen worden gegeten door zoöplankton, leiden cyanotoxines tot een

verminderde filtreeractiviteit, reproductie en zelfs mortaliteit, b.v. bij watervlooien en driehoeksmosselen.

- Planktonetende vissoorten accumuleren de toxines door de opname van zoöplankton met als mogelijk gevolg leverschade en sterfte.
- Vogels kunnen door opslobberen van algenbiomassa en door het foerageren op vis en driehoeksmosselen toxines opnemen en leverschade oplopen of sterven.
- Huisdieren kunnen door het drinken van het water worden vergiftigd. Gevallen van vergiftiging van rundvee en honden zijn beschreven (Chorus & Bartram 1999).

2.2 Aanleiding onderzoek

Cyanobacteriën horen bij de natuurlijke soortensamenstelling van fytoplankton. Maar in de laatste jaren traden in sommige wateren steeds vaker bloeien van (toxische) cyanobacteriën op. Gelijktijdig werd massale vis – en vogelsterfte gerapporteerd (Ijsselmeer 1995, Volkerak-Zoommeer 2002, Oostvaardersplassen 2003). Deze incidenten riepen de volgende vragen op:

Bestaat er een samenhang tussen de sterfte en cyanobacteriënbloeien? Wat zijn de risico's van (toxische) cyanobacteriën voor het ecosysteem en met name voor vissen en vogels?

Tijdens de vogelsterftes in het Volkerak-Zoommeer (2002) en in de Oostvaardersplassen (2003) werd verlamming aangetoond als ziekteverschijnsel. Zo werd de sterfte dan ook snel toegeschreven aan botulisme. Maar het door sommige cyanobacteriegeslachten geproduceerde neurotoxine "anatoxine" werkt ook op het zenuwstelsel en spieren en kan door verlamming tot sterfte leiden.



Figuur 1. Stervende eenden in het Volkerak-Zoommeer 2002 (links) en in de Oostvaardersplassen 2003 (rechts)

Dit document zal een overzicht geven over waarden van microcystines in enkele componenten van de voedselketen en het mogelijke verband tussen de toxines en de opgetreden massale sterfte van vissen en vogels.

Het oorspronkelijke onderzoeksplan was, om vanaf mei en tot en met oktober verschillende locaties in het Volkerak-Zoommeer waar in 2002 de meeste dode vogels werden gevonden te bemonsteren. De monsters van tijden zonder cyanobacteriënbloei zouden dienen als achtergrondwaarden. Echter werden in 2003 in het VZM geen dode vogels of vissen gevonden, daarom kon het oorspronkelijke plan van een ecologisch monitoring naar cyanotoxines in fytoplankton, vissen en vogels niet worden uitgevoerd.

Maar om toch meer zicht op cyanotoxines als doodsoorzaak van vogels en vissen te krijgen zal worden gebruik gemaakt van gegevens van

- Het Volkerak-Zoommeer (2002 en 2003)
- De Oostvaardersplassen (2003)
- Het IJsselmeer.

3 Methode

De watermonsters werden koel en donker getransporteerd en bewaard tot ze geanalyseerd werden. De soortensamenstelling van het fytoplankton werd gedetermineerd door het RIZA (IMLB). De fytoplanktensamenstelling werd bepaald volgens het RIZA werkvoorschrift 8140-2.106 (2002). Daarbij werden de cyanobacteriën op soort gedetermineerd en hun procentueel aandeel aan de totale hoeveelheid fytoplankton berekend.

Vershillende typen microcystines (MC - RR, MC-LR, MC- LW en MC-LF) werden geanalyseerd door het RIZA (IMLO). Microcystines in de watermonsters werden bepaald volgens het RIZA werkvoorschrift 8140-5.354 (2002). De totale hoeveelheid is aangegeven in MC-equivalenten.

Daarnaast werden data gebruikt afkomstig van verschillende bronnen.

1. Microcystinegehaltenes van het zwemwateronderzoek 2002 en 2003 (Rijkswaterstaat- Directie Zeeland).
2. Gegevens van het IJsselmeeronderzoek (Wolfstein 2004 in prep.)
3. Gegevens van onderzoek naar microcystines in het Eemmeer en de Oostvaardersplassen (Wolfstein 2003)

4 Resultaten

4.1 Het Volkerak-Zoommeer

2002

In de nazomer van 2002 trad in het Volkerak-Zoommeer een massale vogelsterfte op. In de tijd van 22 augustus tot 24 oktober werden op de locaties Princesseplaat, Noordplaat, Plaat van de Vliet, Slikken van de Heen, Speelmansplaten, Molenplaat, Oude Tonge, Boerenplaat, en Ooltgensplaat 5125 dode vogels geraapt, waarvan ca. 50% winter- en zomertalingen. De vogelsterfte werd in verband gebracht met het gelijktijdig optreden van massale blauwalgenbloei en drijfslagen. In opdracht van Rijkswaterstaat-Directie Zeeland werden enkele vogellevers op microcystines (MC) onderzocht en werden er waarden gemeten van maximaal 113 µg MC-equivalenten/g lever (mondelijke medeling AquaSense). Daarnaast werden levers en hersenen van 17 vogels onderzocht in het "Institut für Gewässerkunde und Binnenfischerei" in Berlijn (Duitsland). In zeven monsters konden gehalten van verschillende typen microcystines of sporen ervan worden gedetecteerd (tabel 2). Dominante microcystines waren MC-LR en MC-RR.

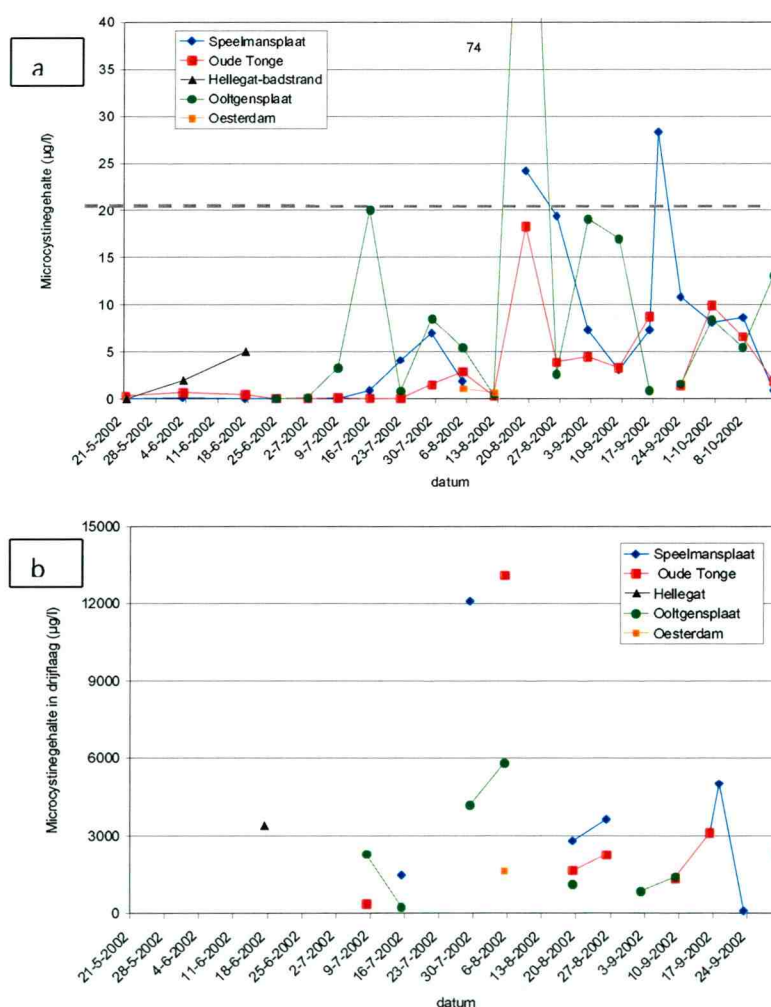
Tabel 2: Microcystinegehalten in levers en hersenen van vogels uit het Volkerak-Zoommeer (2002)

| Vogel | MC-LR | MC-RR | MC-YR | MC-LA | MC-LW | MC totaal |
|----------------------|-----------------------------|----------|----------|-------|-------|-----------|
| Lever Knobbelzwaan | 1,4µg/g | 2,3µg/g | 1,2 µg/g | n.d. | n.d. | 4,9µg/g |
| Hersen Wintertaling1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Wintertaling2 | 2,6µg/g | 1,7 µg/g | n.d. | n.d. | n.d. | 4,3µg/g |
| Hersen Wintertaling2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Wintertaling3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Wintertaling4 | Sporen | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Wintertaling5 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen wintertaling6 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Wintertaling6 | 1,2µg/g | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 1,2µg/g |
| Lever Wintertaling7 | 3,5µg/g | 1,4µg/g | 0,8µg/g | n.d. | n.d. | 5,7µg/g |
| Hersen Wintertaling7 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Fuut1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Fuut 1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Pijlstaart1 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Pijlstaart2 | Sporen | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Pijlstaart2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Wildeend1 | Sporen | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Wildeend2 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Kuifeend | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever Zilvermeeuw | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Hersen Silvermeeuw | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | |
| Lever wintertaling | Geanalyseerd door AquaSense | | | | | 113 µg/g |
| Lever wintertaling | | | | | | 0,9 µg/g |

n.d = niet detecteerbaar

Data afkomstig van de locatie "Steenbergen" (MWTL) tonen in de maanden augustus en september een dominantie aan van cyanobacteriën (meer dan 90% van de totale hoeveelheid fytoplankton) en met name van het geslacht *Microcystis*, die bekend staat voor de productie van microcystines. *Microcystis* werd begeleid door de cyanobacteriënsoorten *Pseudoanabaena mucicola* en *Aphanizomenon* sp. (slechts in september en < 1 % van de totale hoeveelheid). Maar de vogels toonden ook verlamningsverschijnselen, wat een gevolg van een vergiftiging door het botulisme-bacterium *Clostridium botulinum* of door een ander cyanotoxine – een neurotoxine – kan zijn. Dit gif wordt b.v. door het cyanobacteriëngeslacht *Aphanizomenon* geproduceerd. In opdracht van Directie Zeeland worden 2 vogels op botulisme onderzocht - met een negatieve uitkomst voor botulisme. Het neurotoxine "anatoxine" kon ook niet worden aangetoond in de watermonsters (medeling AquaSense).

In het kader van het zwemwateronderzoek werden op verschillende locaties in het Volkerak-Zoommeer watermonsters genomen voor microcystine analyse (figuur 2a&b, data afkomstig van Dir. Zeeland).



Figuur 2a&b. Microcystinegehalten op verschillende locaties in het VZM in 2002 (b: in drijfslagen). De grijze stippellijn is de normwaarde voor zwemverbod.

Daarvoor werden de locaties Speelmansplaat, Oude Tonge, Hellegatbadstrand, Ooltgensplaat en Oesterdam bemonsterd. Het hoogste gehalte in het water werd gemeten op 19 augustus bij Ooltgensplaat (74 µg/l). Veel hogere waarden konden echter in drijfslagen worden gemeten: een maximum van 13100 bij Oude Tonge (5 augustus)!

2003

Helaas kon pas in augustus met dit onderzoeksprogramma worden begonnen, zodat er behalve augustus geen fytoplankton- en microcystinegegevens van de monsterplekken beschikbaar zijn (tabel 3). Maar met de voorlopige resultaten van het fytoplanktononderzoek van de locatie "Steenbergen" (MWTL) en tabel 3 is er al een beeld te schetsen van de ontwikkeling van cyanobacteriën en met name *Microcystis* sp.. In mei was *Microcystis* de enige aanwezige cyanobacteriënsoort en maakte 2% van de totale fytoplanktonpopulatie uit. In juni ging het aandeel cyanobacteriën aan de populatie omhoog tot 38%. De dominante cyanobacteriesoorten waren *Aphanizomenon* sp., *Pseudoanabaena mucicula* en dan pas *Microcystis* sp.. Maar gezien vanuit alle fytoplanktonsoorten was na *Aphanizomenon* sp. de kiezelalg *Skeletonema* sp. dominant. Helaas zijn er geen data van juli, maar in augustus hadden cyanobacteriën en met name *Microcystis* een aandeel van 80- 100% op de vier onderzochte locaties.

Tabel 3. Soortensamenstelling fytoplankton op verschillende locaties en 2 dieptes op 14 augustus 03

| Datum/ locatie | Totaal/ml | % cyanobacteriën | Dominante cyanobacteriënsoort |
|-----------------------|-----------|------------------|--|
| 14/08 MP1 diep | 848979 | 78 | 1. Merismopedia minima, 2. Microcystis |
| 14/08 MP2 " | 759872 | 87 | Microcystis |
| 14/08 MP3 " | 289958 | 93 | Microcystis |
| 14/08 MP4 " | 373091 | 98 | Microcystis |
| 14/08 MP1 oppervlakte | 1518199 | 87 | 1. Merismopedia minima, 2. Microcystis |
| 14/08 MP2 " | 111461868 | 100 | Microcystis |
| 14/08 MP3 " | 335128 | 96 | Microcystis |
| 14/08 MP4 " | 282656 | 89 | Microcystis |

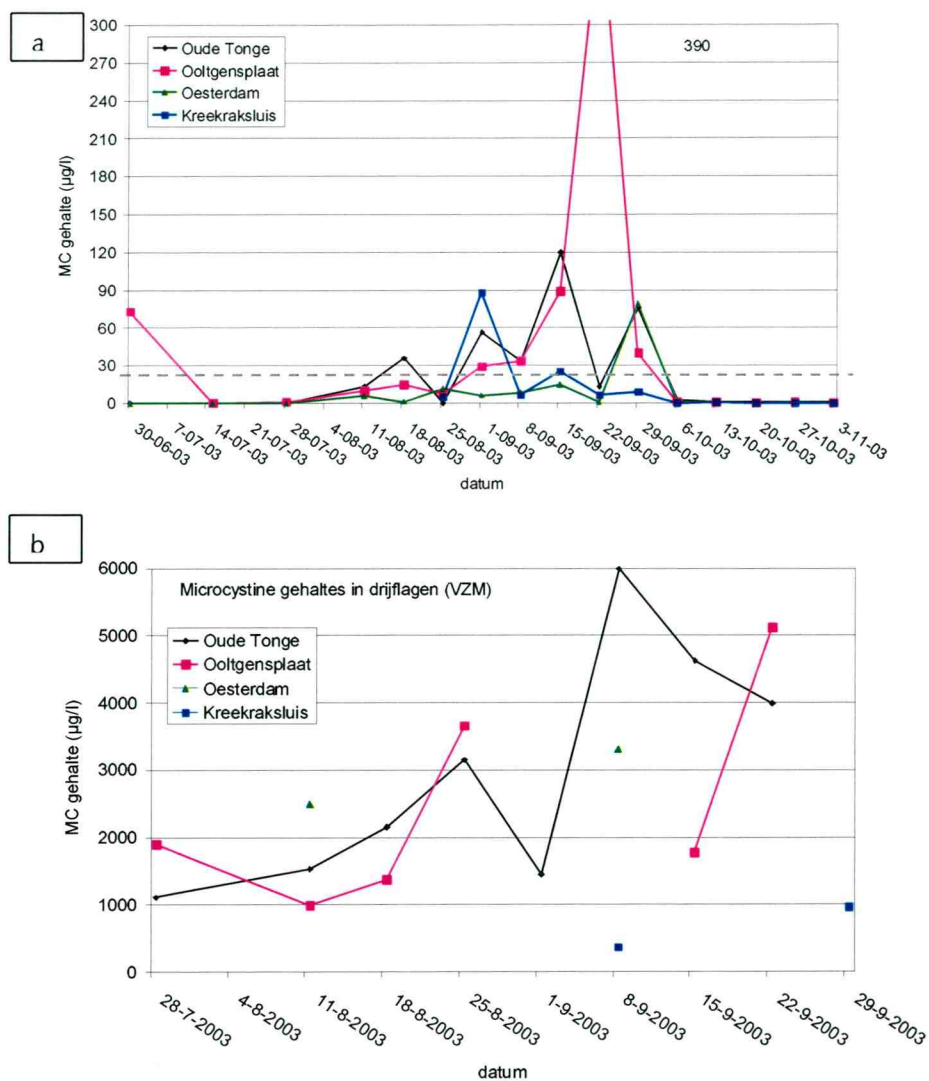
MP1= Plaat van de Vliet/Slikken van de Heen, MP2= Speelmansplaten, MP3= Oude Tonge, MP4= Dintelse Gorzen

Van dezelfde monsters werd een microcystineanalyse uitgevoerd. Met uitzondering van de locatie "MP2 (Speelmansplaten) oppervlakte", waar 46 µg/l werd gemeten, schommelden de waarden rond 1 µg/l.

Daarnaast zijn er gegevens van microcystinegehalten beschikbaar afkomstig uit het zwemwateronderzoek van de volgende locaties: Oude Tonge, Ooltgensplaat, Oesterdam en Kreekraksluis (figuur 3).

De hoogste waarde (390 µg/l) werd gemeten bij Ooltgensplaat op 22 september. In een drijfslag werd maximaal 5990 µg/l gemeten (Oude Tonge, 5 september).

De microcystinegehalten in het water waren in 2003 wel hoger dan in 2002, maar de maximale waarde van 13100 µg/l in een drijfslag in 2002 werd niet bereikt in 2003.



Figuur 3 a&b. Microcystinegehalten op verschillende locaties in het VZM in 2003 (b: in drijfslagen). De grijze stippellijn is de normwaarde voor zwemverbod.

5 Discussie en conclusies

In dit hoofdstuk zullen de resultaten bediscussieerd en in relatie worden gezet met literatuurgegevens en de uitkomsten van een studie naar de effecten van cyanotoxines in het IJsselmeer (Wolfstein 2004 in prep., AquaSense 2002 a&b) om de vogelsterfte mogelijk te kunnen verklaren.

Incidenten van massale vogelsterfte en gelijktijdig optreden van cyanobacteriënbloei werden vaker gerapporteerd. Toch kon er nooit een direct link tussen beide observaties worden gelegd, want vaak trad gelijktijdig botulisme op.

In twee Canadese meren stierven in 1996 ongeveer 200.000 vogels aan botulisme. Maar er werd aangenomen, dat ook cyanobacteriën van de geslachten *Microcystis* en *Aphanizomenon* bijdroegen aan de sterfte, doordat ze door hun toxineproductie (MC-LR en anatoxine-a) de weg bereidden voor de uitbraak van grootschalig botulisme en zo bijdroegen aan de dood van vogels (Murphy et al. 2000). De aanwezigheid van een sublethale dosis microcystine versterkt de toxiciteit van anatoxine (Chorus et al. in Chorus 2001). In de zomer van 2003 vond er massale vogelsterfte plaats in de Oostvaardersplassen en trad er gelijktijdig de cyanobacterie *Anabaena flos-aquae* op. Helaas zijn er geen data over anatoxine beschikbaar, maar aangezien de aanwezigheid van microcystine in de monsters en *A. flos-aquae*, die bekend staat voor de productie van anatoxine-a, zouden cyanotoxines een bijdrage kunnen hebben geleverd aan de dood van de vogels. Daarnaast werd in "het Bovenwater" een plas dichtbij de Oostvaardersplassen (niet in verbinding staand) in augustus naast de aanwezigheid van *Anabaena flos-aquae* ook 1,4 µg anatoxine-a /g drooggewicht seston, 4,4 µg/g MC-LR en 6,8 µg/g MC-LA aangetoond.

Ook Krienitz et al. (2003) rapporteerden een massale sterfte van ca. 30.000 flamingo's in Kenya. De vogels toonden symptomen die op intoxicatie door een neurotoxine duidde, vergelijkbaar met die symptomen die door anatoxine-a kunnen worden veroorzaakt. Aanwezige cyanobacteriënsoorten waren *Phormidium terebriformis*, *Oscillatoria willei*, *Spirulina subsalsa* en *Synechococcus bigranulatus*. Er konden vier verschillende typen microcystine worden gedetecteerd: MC-LR, RR, LF en YR met een totale gehalte van 221 - 845 µg MC-LR equivalenten /g dw in de cyanobacteriën. Daarnaast werd maximaal 18 µg anatoxine-a /g dw aangetoond. De analyse van de maaginhoud van twee vogels toonde waarden van 0,2 µg MC-LR equivalenten/ g versgewicht en 4,3 µg anatoxine-a /g versgewicht. Takahashi & Kaya (1993) rapporteerden een LD₅₀ waarde (concentratie waarbij 50% van de beesten stierven) van 256 µg MC-RR /kg vogel voor kwartels. Het gif werd echter interperitorinaal toegediend, dat betekent in de buikholte gespoten. Op basis van de aanwezigheid van de cyanotoxines in (a) het milieu en (b) in de maag en de symptomen van de vogels gaan Krienitz et al. (2003) uit van een bijdrage van cyanotoxines aan de dood van de flamingo's. Uiteindelijk concludeerden de auteurs, dat multiple stress de doodsoorzaak was.

5.1 Vogelsterfte Oostvaardersplassen

Vanaf juni t/m oktober vond in de Oostvaardersplassen massale vogelsterfte plaats (ca. 10.000 dode vogels met een piek in augustus). In het water werden grote hoeveelheden van de cyanobacteriesoort *Anabaena flos-aquae* gevonden. *Microcystis* trad nauwelijks op. Er werd maximaal 165 µg/l microcystine gemeten. De vogels (vooral wintertalingen) toonden verlamingsverschijnselen. In het Eemmeer daartegen, waar in drijfslagen van *Microcystis* sp. MC-gehalten tot 5200 µg/l werden gemeten, trad nauwelijks sterfte op. Van de onderzochte vogels werden 18 dood ingeleverd bij het CIDC en 21 nog levend maar met verlamingsverschijnselen. De vogels werden in het laboratorium gedood en onderzocht op botulisme, maaginhoud en afwijkingen van de lever. In de levers van 30 vogels werd geen botulinum toxine aangetoond terwijl er in de levers van 9 vogels wel botulinum toxine type C werd aangetoond. Deze laatste 9 dieren zijn alle als kadaver aangeleverd. Of deze dieren ook daadwerkelijk aan botulisme gestorven zijn is niet met zekerheid te zeggen omdat toxineproductie ook postmortaal kan optreden. De versheid van het kadaver speelt dan een belangrijke rol. Alleen bij heel verse kadavers is het zeer waarschijnlijk dat de dieren aan botulisme gestorven zijn. Daarnaast hoeft een negatieve uitslag niet te betekenen, dat het botulinum toxine niet tot dood heeft geleid. Het toxine wordt immers irreversibel gebonden aan de eindplaatjes van de motorische zenuwen en is dan niet meer in de circulatie aantoonbaar.

In 15 van de 37 onderzochte vogellevers kon microcystine worden aangetoond. De gehalten varieerden van 5 tot 38 µg/g lever (grijze waarden in tabel 4: totaal gehalte van microcystine = equivalenten, geanalyseerd door Aquasense). Aan de vogels van 31 oktober is geen onderzoek op microcystines verricht, maar in die tijd heerste er al lang geen cyanobacteriënbloei meer in de Oostvaardersplassen. Tien vogellevers werden opgesplitst in tweeën waarvan een deel op microcystine werd onderzocht bij het RIZA, het ander bij de Abo Akademi universiteit in Turku (Finland). Allebei instituten gebruikten de LC-MS methode (liquid chromatography/ mass spectrometry). In tegenstelling met de resultaten van het RIZA (tabel 4), konden in Finland geen microcystines worden gedetecteerd. Een aannemelijke oorzaak is een verschil in de detectie-limits van de methode. In ieder geval zullen de waarden met voorzichtigheid moeten worden betracht.

In het "Bovenwater" een plas dichtbij de Oostvaardersplassen werd in augustus naast de aanwezigheid van *Anabaena flos-aquae* ook 1,4 µg anatoxine-a /g drooggewicht seston, 4,4 µg/g MC-LR en 6,8 µg/g MC-LA aangetoond. De wateren staan niet met elkaar in verbinding.

De bij intoxicaties met microcystine gevonden uitgebreide tot massale levernecrose is in geen enkel geval gezien. De levers van 7 vogels bleken op grond van gevorderde autolyse voor histologisch onderzoek niet geschikt. Echter toonde een deel van de levers single celnecrose diffuus optredend in het leverweefsel, wat een gevolg van opname van toxische stoffen of metabolieten zou kunnen zijn. De levers van 13 vogels toonden een acute degeneratie, variërend van mild (2) tot matig (9) of matig tot ernstig (2). In zes gevallen (van 19-08-03) waren deze degeneratieve veranderingen vergezeld van een milde tot matige, vaak

diffuus in de lever optredende celnecrose van hepatocyten. In zes gevallen zijn enkele of meerdere parasieten in het leverparenchym ontdekt en in 14 gevallen bestond een milde of matige ontsteking in periportale levergebieden.

Tabel 4. Uitslagen vogelonderzoek (op botulisme, microcystines en organische afwijkingen)

| Vinddatum/ locatie | Vogelsoort | Levend of dood | Botulisme (pos./neg.) | Microcystine- onderzoek | Opmerkingen |
|-----------------------|--------------|------------------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 16-7 (O) | Wilde eend | Dood | - | 6,6 µg MC /g lever | Matig longoedeem |
| | Wilde eend | Dood | - | 38,4 µg MC / g lever | Matig longoedeem |
| 22-7 (O) | Wilde eend | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Wilde eend | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| 30-7 (E) | Nijlgans | Dood | + | n.gem. | Heftig longoedeem |
| | Nijlgans | Levend (verlamd) | - | n.gem. | Heftig longoedeem |
| | Nijlgans | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Nijlgans | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| 14-8 (O) | Slobeend | Dood | - | n.gem. | |
| | Wintertaling | Dood | - | n.gem. | |
| | Wilde eend | Dood | - | n.gem. | |
| 15-8 (O) | Wintertaling | Dood | + | n.gem. | Heftig longoedeem, maden |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 5µg MC-RR/ g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 20µg MC-RR/g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 6 µg MC-RR/ g lever | Longoedeem |
| | Lepelaar | Dood | - | n.gem. | Longoedeem |
| 15-8 (K) | Nijlgans | Dood | + | n.gem. | Longoedeem |
| 19-8 (O) | Wilde eend | Levend (verlamd) | - | 6 µg MC-RR/ g lever | |
| | Kraakeend | Levend (verlamd) | - | 8 µg MC-RR/ g lever | |
| | Kraakeend | Levend (verlamd) | - | 10µg MC-RR/g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 9 µg MC-RR/ g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 9 µg MC-RR/ g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 6 µg MC-RR/ g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 6 µg MC-RR/ g lever | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | 26µg MC-RR/g lever | |
| | Wintertaling | Dood | + | 8 µg MC-RR/ g lever | |
| | Slobeend | Dood | + | 15µg MC-RR/g lever | |
| 19-8 (O) | Kokmeeuw | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Kokmeeuw | Dood | - | n.gem. | |
| 20-8 (O) | Kluut | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Watersnip | Dood | - | n.gem. | |
| 20-8 (O) | Wilde eend | Dood | + | n.gem. | |
| | Wintertaling | Dood | + | n.gem. | |
| | Wintertaling | Dood | + | n.gem. | |
| | Slobeend | Dood | + | 4µg MC-RR/ g lever | |
| 3-9 (E) | Meeuw | Dood | - | n.gem. | Groen verenkled |
| 31-10(O) | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |
| | Wintertaling | Levend (verlamd) | - | n.gem. | |

O= Oostvaardersplassen, K = Ketelmeer, E = Eemmeer, n. gem. = niet gemeten

Over het algemeen worden deze veranderingen geacht weinig functionele betekenis te hebben. Het histologisch onderzoek van de levers levert geen eenduidig beeld en veranderingen zoals bij microcystineintoxicatie beschreven zijn niet gevonden. Rekening moet worden gehouden met het feit dat de monsters van verschillende plaatsen komen en dus geen homogene verzameling vormen.

In de maag van de vogels kon met het blote oog geen voedselresten worden gevonden. Veel vogels hadden longoedemen welke kunnen wijzen op onvolledige doorbloeding, hetgeen een gevolg maar ook de doodsoorzaak kan zijn.

Van de totaal onderzochte 247 dieren (watervogels en vissen) in 2003 waren 131 positief op toxine type C en incidenteel D of E (mondel. mededeling CIDC).

Op basis van de gegevens kan geen duidelijke doodsoorzaak worden aangegeven, waarschijnlijk waren meerdere factoren verantwoordelijk voor de sterfte.

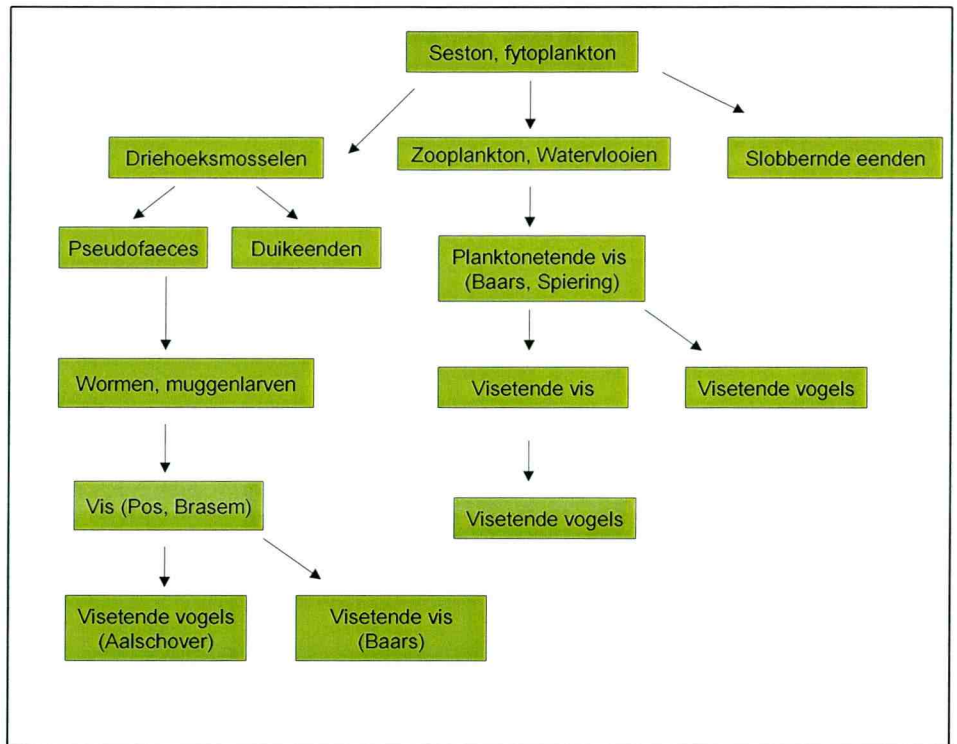
5.2 IJsselmeerstudie

Tijdens de zomermaanden van de jaren 1997 t/m 1999 vond er een maandelijkse monitoring plaats op twee raaien in het IJsselmeer (AquaSense 2002a). Daarbij werden verschillende parameters zoals het sestongehalte, de soortensamenstelling fyto- en zoöplankton en het microcystinegehalte onderzocht. In 1998 was er een sterke dominantie van meerdere *Microcystis* soorten, maar in 1999 domineerde *Planktothrix agardhii*. *Microcystis* was toen co-dominant. Het gemiddelde microcystinegehalte van het seston varieerde tussen 1 en 50 µg/l. Opvallend was dat de microcystinegehalten in het "Planktothrix"-jaar de 10 µg/l nooit overschreden, hoewel er in 1998 waarden tot 50 µg/l werden gemeten. Echter konden hoge microcystinegehalten meestal niet worden gerelateerd aan hoge aantallen *Microcystis*.

Om überhaupt effect te hebben moeten microcystines eerst worden opgenomen door het inslikken van water en fytoplankton, of het eten van fytoplankton door bijvoorbeeld zoöplankton of mosselen. Via deze route kunnen de toxines terecht komen in vissen of vogels (figuur 4). Wanneer met het voedsel opgenomen toxines niet volledig worden uitgescheiden of afgebroken, kunnen ze accumuleren in het organisme en verder worden doorgegeven in de voedselketen.

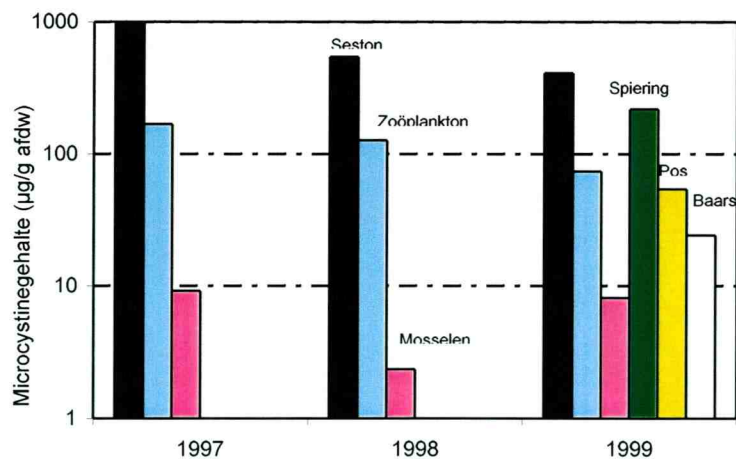
Bioaccumulatie wordt gezien als het opstapelen van een specifieke substantie vanuit de leefomgeving in het lichaam van een levend organisme. Een stof accumuleert als het sneller wordt opgenomen en opgeborgen dan afgebroken of uitgescheiden.

Biomagnificatie betekent de verhoging van de concentratie van een substantie, als die van de ene trofielaag naar de volgende wordt doorgegeven. Daarbij is er een onderscheid tussen de planktische voedselketen via zoöplankton en de benthische voedselketen via driehoeksmosselen, pseudofaeces, wormen etc.



Figuur 4. Mogelijke doorgifteroutes van toxines in het voedselweb

In de studie werden naast MC-gehalten in het seston/fytoplankton ook de gehalten in zoöplankton, driehoeksmosselen en vis geanalyseerd. In figuur 5 is het verloop van de gemiddelde MC-gehalten van fytoplankton, zoöplankton, mosselen en vislevers weergegeven.



Figuur 5. Gemiddelde microcystinegehalten ($\mu\text{g/g}$ drooggewicht) in verschillende voedselwebcomponenten in het IJsselmeer (1997, 1998, 1999). Boven de stipellijnen waren op basis van de literatuur negatieve effecten te verwachten op vis (10 voor juveniele en 100 voor adulte).

De gehalten van microcystine was altijd het hoogst in fytoplankton, daarna in het zoöplankton. Opvallend is de relatief geringe accumulatie in de mosselen, en de in vergelijking met het fytoplankton hoge microcystinegehalten van Spieringlevers.

Microcystinegehalten van grazende organismen die boven het gehalte van het fytoplankton uitkomen kunnen als aanwijzing voor bioaccumulatie worden beschouwd. De individuele metingen wijzen niet op bioaccumulatie van microcystines. Slechts in een geval kon biomagnificatie worden vastgesteld: in 1999 waren de microcystinegehalten hoger in Spiering dan in zijn voedsel zoöplankton. Spiering is een zoöplanktoneter, en staat dus in de voedselketen dicht bij het fytoplankton. Pos voedt zich voornamelijk met vlokreeften en muggenlarven, terwijl Baars van de onderzochte lengte behalve op zoöplankton en andere ongewervelden ook op vis jaagt (Nijssen & de Groot 1987).

De kritische zoöplankton microcystine-LR gehalten (grijze stippellijnen) waarboven leverschade bij adulte en juveniele Baars zou kunnen voorkomen zijn samen met de in het IJsselmeer gemeten waarden ingetekend in figuur 5. In 37% van de levers van de gevangen vissen werden histologische afwijkingen gevonden die door blootstelling aan microcystines kunnen zijn veroorzaakt. Maar er was weinig relatie tussen het voorkomen van histologische afwijkingen en het microcystinegehalte van de levers.

Voor dit onderzoek relevante conclusies uit de IJsselmeerstudie:

Potentieel toxische cyanobacteriën en hun toxines (microcystines) zijn tijdens het fytoplankton-groeiseizoen bijna altijd in het IJsselmeer aanwezig. Maar slechts 2-11% van de totale hoeveelheid microcystine bestond uit MC-LR, een van de meest toxische varianten.

De microcystines komen ook in de hogere trofieniveau's (zoöplankton, mosselen en vis) terecht.

Er lijkt geen bioaccumulatie of biomagnificatie op te treden: de microcystinegehalten in de hogere trofieniveau's zijn lager dan in het fytoplankton. De blootstelling van hogere trofieniveau's aan microcystine is afhankelijk van het foeragegedrag: op bentisch (mosselen) of planktisch (zoöplankton) levende organismen. Het MC-gehalte is aanzienlijk lager in mosselen.

Microcystine leidden eerder tot chronisch, sublethale dan direct sterfte. De vissterfte is dan ook eerder te verklaren door het optreden van meerdere stressfactoren zoals beschreven in de inleiding.

5.3 Relevantie voor visetende vogels

Het is moeilijk de relevantie van de in de IJsselmeerstudie gemeten microcystinegehalten voor viseters zoals Aalschovers te beoordelen, onder andere omdat het gaat om niet geïdentificeerde microcystine-types waarvan de toxiciteit mogelijk lager kan zijn dan van microcystine-LR. Daarnaast is de hoeveelheid microcystine in andere delen dan de lever niet bekend. Tenslotte zijn er over de gevoeligheid van visetende dieren voor microcystines geen gegevens voorhanden.

Toch is er een schatting gemaakt van het voor Aalscholvers kritische vislever microcystinegehalte (AquaSense 2002a). Daarbij is uitgegaan

van de gevoeligheid van muizen voor oraal toegediende microcystine - LR (NOAEL¹ 40 µg /kg), en een gewicht en dagelijkse voedselbehoefte van Aalscholvers van respectievelijk 2,6 kg en 400 gram vis/dag. Een berekening met deze gegevens levert de kritische waarde op van 75 µg microcystine /gr vis/lever AFDW. De Baarsleveren en de meeste Posleveren hebben microcystinegehalten onder dit niveau. De microcystinegehalten van Spieringleveren liggen hier echter merendeels boven, tot maximaal een factor 12. Baserend op de gemeten concentraties in Spiering, op de resultaten uit het laboratoriumonderzoek en berekeningen in de literatuur is sterfte van visetende vogels niet waarschijnlijk, maar wel het optreden van leverschade.

Microcystine die is opgenomen door bijvoorbeeld driehoeksmosselen verdwijnt vrij snel weer uit het weefsel. Dit betekent dat duikeenden die in de winter foerageren op mosselen niet aan microcystines worden blootgesteld.

Daarnaast zouden slobberende eenden cyanobacteriën en daarmee microcystines kunnen hebben opgenomen. Maar er kon geen ruimtelijke en tijdelijke verbinding worden aangetoond tussen het optreden van hoge microcystineconcentraties en dode vogels. In het Eemmeer waar in september hoge celdichtheden van *Microcystis* sp. werden vastgesteld en microcystinegehalten van ca. 1500 tot 5200 µg/l werden gemeten trad geen vogelsterfte op. Ook in het Volkerak-Zoommeer, waar in de zomer van 2003 microcystinegehalten van maximaal 6000 µg/l werden gemeten, vond geen vogelsterfte plaats. In de Oostvaardersplassen, waar het microcystinegehalte een tienvoud lager was en de cyanobacteriënsoort *Anabaena flos-aquae* domineerde, vond echter massale vogelsterfte plaats. De verlamingsverschijnselen van de vogels wijzen eerder op de aanwezigheid van een neurotoxine of botulisme.

5.4 Hoe erg zijn de effecten uiteindelijk?

Op basis van de tijdens deze studie verkregen resultaten, data uit het IJsselmeer en het Volkerak-Zoommeer en literatuurgegevens wordt geprobeerd om de relevantie van de effecten van microcystines in te schatten voor de hogere trofieniveau's van de voedselketen (vissen en vogels). De gegevens afkomstig van de verschillende studies weerspreken zich deels en de genoemde waarden zijn niet goed te vergelijken (verschillende eenheden van drooggewicht of liter van een monster), daarom is het moeilijk om tot een harde uitspraak te komen. Daarnaast zijn er geen data van de laagste waarden, waarbij een effect kan worden waargenomen bij vogels. De belangrijkste uitkomsten zijn:

1. Bij de in de IJsselmeerstudie waargenomen microcystinegehalten zijn negatieve effecten te verwachten op verschillende niveau's van de voedselketen die zijn gebaseerd op literatuurgegevens van het

¹ No observed adverse effect level. Effecten op histopathologie en serum enzymen zijn beoordeeld.

veel voorkomende en sterk toxische microcystine-LR. Er konden negatieve effecten (leverschade in 37% van de onderzochte vissen) worden aangetoond, maar geen direct verband worden gelegd tussen de MC-gehalten en de schade. Daarnaast kwamen in het IJsselmeer meestal andere, niet nader geïdentificeerde microcystine-types voor, die minder (maar ook meer) toxisch kunnen zijn.

2. Baserend op de gemeten concentraties in Spiering, op resultaten uit het laboratoriumonderzoek en berekeningen in de literatuur is sterfte van visetende vogels niet waarschijnlijk, maar wel het optreden van leverschade.
3. Daarnaast is een deel van de microcystine niet vrij extraheerbaar (Wolfstein 2004 in prep.). Het is echter mogelijk, dat dit gedeelte microcystine, gebonden aan eiwitfosfatases van bijvoorbeeld *Daphnia* niet erg toxisch is voor zoöplanktonetende vis. Want eerst moet het toxine loskomen van de fosfatase voordat het kan binden aan fosfatase van b.v. Spiering.
4. Er kon in 2003 geen ruimtelijke en tijdelijke verbinding worden aangetoond tussen het optreden van hoge microcystineconcentraties en dode vogels in het Eemmeer en het Volkerak-Zoommeer. In 2002 waren er wel gelijktijdig vogelsterfte en hoge microcystinegehalten in het Volkerak-Zoommeer.
5. Het in de vogels uit de Oostvaardersplassen gedetecteerde MC-RR is minder toxisch dan het type MC-LR. Maar de vogels toonden verlamningsverschijnselen, wat een gevolg van een vergiftiging door een ander cyanotoxine – neurotoxine “anatoxine”- kan zijn, een gif dat b.v. door *Anabaena flos-aquae* wordt geproduceerd. Bovendien werd in “het Bovenwater” een plas dichtbij de Oostvaardersplassen (staan niet in verbinding) naast de aanwezigheid van *Anabaena flos-aquae* ook anatoxine-a, MC-LR en MC-LA aangetoond. Een combinatie van beide toxines en ook botulisme zou een rol bij de sterfte hebben gespeeld.

Conclusie: Er kan momenteel geen duidelijke uitspraak over de oorzaak van de vogelsterfte worden gedaan, omdat een direct verband tussen microcystinegehalten en mogelijk schadelijke effecten bij diverse organismen ontbreekt. Maar al in al is er een sterke aanwijzing dat cyanotoxines een bijdrage hebben geleverd aan de sterfte van de vogels.

6 Literatuur

- AquaSense 1996. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines. Een literatuurstudie. In opdracht van Rijkswaterstaat. Rapportnr. 0786.
- AquaSense 2002a. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer . I. monitoring 1997 t/m 1999.-In opdracht van:RIZA. Rapportnummer 1030-7a.
- AquaSense 2002b. Ecologische effecten van cyanobacterietoxines in het IJsselmeer .II. Experimenten 1996 t/m 2000. In opdracht van: In opdracht van: RIZA. Rapportnummer 1030-7b.
- Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C, Eddy FB, Metcalf JS, Codd GA 2002. Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicology* 60 (3-4): 223-231
- Chorus, I. & Bartram J. (eds.) 1999. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London.
- Chorus, I. 2001. Cyanotoxins: Occurrences, causes, consequences. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Krienitz, L., Ballot, A., Kotut, K., Wiegand, C., Pütz, S., Metcalf, J.S., Codd, G.A. & Pflugmacher, S. 2003. Contribution of hot springs cyanobacteria to the mysterious deaths of Lesser Flamingos at Lake Bogoria, Kenya.- *FEMS Microbiology Ecology* 43: 141-148.
- Metcalf JS, Beattie KA, Ressler J, Gerbersdorf S, Pflugmacher S, Codd GA 2002. Cross-reactivity and performance assessment of four microcystin immunoassays with detoxication products of the cyanobacterial toxin, microcystin-LR. *J. water supply res. technol.-Aqua* 51 (3): 145-151.
- Murphy T, Lawson A, Nalewajko C, Murkin H, Ross L, Oguma K, McIntyre T 2000. Algal toxins - initiators of avian botulism? *Environ Toxicol.* 15:558-567
- Nijssen, H & S.J. de Groot 1987. De vissen van Nederland. Uitg. KNNV, Utrecht.
- RIZA 2002. Oppervlakte fytoplankton analyse. Werkvoorschrift 8140 - 2.113.
- RIZA 2002. De bepaling van het gehalte aan microcystine-LR in cyanobacteriën en oppervlaktewater met LC-DAD-MS. Werkvoorschrift 8140-5.354.
- Takahashi, S. & Kaya, S. 1993. Quail spleen is enlarged by microcystin-RR as a blue-green algal compound. *Nat. Toxins* 7: 81-84.
- Williams DE, Craig M, Dawe SC, Kent ML, Holmes CFB, Andersen RJ 1997. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Chem. Research in toxicology* 10 (11): 1293-1293.
- Wolfstein, K. 2004 (in prep.). Ecologische effecten van cyanotoxines in het IJsselmeer. Monitoring en experimenten. RIZA werkdocument 2004...x

Classic DFS, 3 mm for 16-30 sheets 325
www.bindomatic.com