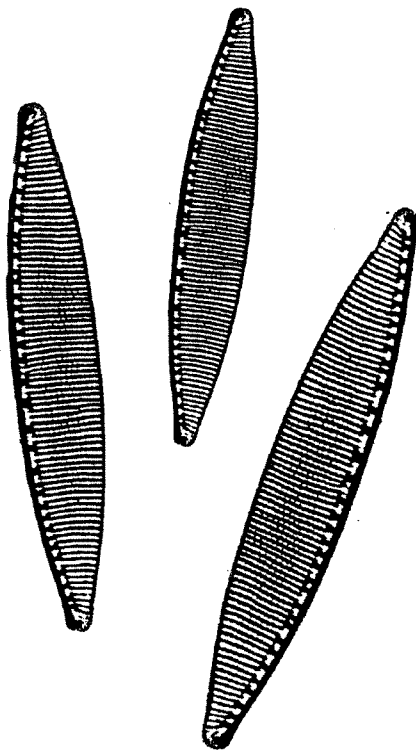


RAPPORT LNR 3539-96

Vorgehensweise bei der
Durchführung des
Nitzschia - Biotests zum
Nachweis von
Blaualgentoxinen



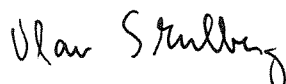
Hovedkontor Postboks 173, Kjelsås 0411 Oslo Telefon (47) 22 18 51 00 Telefax (47) 22 18 52 00	Sørlandsavdelingen Televeien 1 4890 Grimstad Telefon (47) 37 29 50 55 Telefax (47) 37 04 45 13	Østlandsavdelingen Sandvikaveien 41 2312 Ottestad Telefon (47) 62 57 64 00 Telefax (47) 62 57 66 53	Vestlandsavdelingen Nordnesboder 5 5008 Bergen Telefon (47) 55 32 56 40 Telefax (47) 55 32 88 33	Akvaplan-NIVA A/S Søndre Tollbugate 3 9000 Tromsø Telefon (47) 77 68 52 80 Telefax (47) 77 68 05 09
--	---	--	---	--

Titel Vorgehensweise bei der Durchführung des <i>Nitzschia</i> -Biotest zum Nachweis von Blaualgentoxinen.	Laufnummer (z. Bestellung) 3539-96	Datum 1997.01.07
	Projektnummer 93404	Seiten Preis 13 -
Verfasser Heike Kiefer Tone Jøran Oredalen Olav Skulberg	Fachgebiet Hydrobiologie	Verteilung frei
	geographisches Gebiet -	Druck NIVA

Auftraggeber Norwegisches Institut für Wasserforschung (NIVA).	Auftragsreferenz 408
---	-------------------------

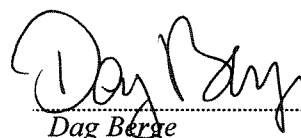
Zusammenfassung Der Bericht beschreibt die Vorgehensweise für eine Biotestmethode zum Nachweis von ökologischen Effekten von Blaualgentoxinen. Der verwendete Testorganismus ist ein Klon der pennatischen Kieselalgenart <i>Nitzschia</i> . Der Test wird auf festem Medium durchgeführt, auf dessen Oberfläche die <i>Nitzschia</i> -Zellen gleichmäßig verteilt werden. Der Teststoff, extrahiert aus Blaualgen, wird in ein Loch im Zentrum der Agarschalen gegeben. Je nach Eigenschaft der wirksamen Stoffe, die in das Medium diffundieren, können die Algenzellen mit Flucht, verändertem Wachstum oder Zelltod reagieren. Die Reaktionen werden durch sichtbare Felder mit hohen oder niedrigen Zellkonzentrationen der Testorganismen deutlich.
--

vier deutsche Stichworte 1. <i>Nitzschia</i> 2. Biotest 3. Cyanotoxine 4. Cyanophyceae	vier englische Stichworte 1. <i>Nitzschia</i> 2. biotest 3. cyanotoxins 4. Cyanophyceae
---	--



Olav Skulberg

Projektleiter



Dag Berge

Forschungschef

ISBN 82-577-3086-6

NORWEGISCHES INSTITUT FÜR WASSERFORSCHUNG

Oslo

93404

**Vorgehensweise bei der Durchführung des
Nitzschia - Biotests zum Nachweis von
Blualgentoxinen**

Oslo, den 10. September 1996

Projektleiter:	Olav Skulberg
Mitarbeiter:	Heike Kiefer Tone Jøran Oredalen Randi Skulberg Bjørn Faafeng
Für die Verwaltung:	Dag Berge

VORWORT

Die Erforschung der Toxinproduktion von Blaualgen sowie der stofflichen und biologischen Eigenschaften der Toxine erfordert eigene experimentelle Methoden. Die aktuell bekannten Sekundärmetaboliten umfassen mehrere Kategorien chemischer Verbindungen mit unterschiedlichen physiologischen und ökologischen Wirkungen. Um die existierenden kausalen Zusammenhänge zu beleuchten, ist es notwendig, eine Auswahl von Biotests benutzen zu können.

NIVA hat durch Feld- und Laborstudien die Erfahrungsgrundlage gesammelt, daß Kieselalgen der Gattung Nitzschia empfindsam auf Stoffwechselprodukte toxischer Natur reagieren, die von Blaualgen gebildet werden. Im Folgenden wird eine Biotestmethode für den Nachweis von Giftwirkungen in Verbindung mit Blaualgentoxinen beschrieben, welche auf der Kieselalge NIVA-BAC 38 als Testorganismus basiert.

Oslo, den 10. September 1996

Olav Skulberg

INHALT

1. PRINZIP DES TESTS	3
2. TESTORGANISMUS	3
3. VORGEHENSWEISE	3
3.1 Kultivierung von <i>Nitzschia</i> in Vorkulturen	5
3.2 Gießen der Agarplatten	5
3.3 Aussaat und Kultivierung von <i>Nitzschia</i> auf Agarplatten	6
3.4 Herstellung der Testlösung	6
3.5 Ausstanzen des Lochs und Zugabe der Testlösung	6
3.6 Auswertung des Tests	8
4. NÄHRLÖSUNGEN	9
5. PRAKTISCHES BEISPIEL	10
5.1 Testlösungen:	10
5.2 Ergebnis	10
6. ZUSAMMENFASSUNG DER ANMERKUNGEN	13
7. LITERATUR	13

1. PRINZIP DES TESTS

Eine Kultur der Kieselalge *Nitzschia* wird auf Agarmedium in Petrischalen kultiviert. Nachdem sich die Algen im Laufe eines Tages auf der Oberfläche etabliert haben, wird in der Mitte einer jeden Agarplatte ein Loch ausgestanzt. Das Stanzloch wird mit der Testlösung (z.B. Algenkonzentrat) gefüllt, welche gradweise in den Agar diffundiert. Auf diese Weise kommt der wirksame Stoff in Kontakt mit den Testorganismen und wird zusammen mit den Nährstoffen aus dem Agarmedium aufgenommen. Je nach Eigenschaften der wirksamen Stoffe, können die Algenzellen mit Flucht, verändertem Wachstum oder Zelltod reagieren. Diese Reaktionen zeigen sich nach 4-6 Tagen als makroskopisch sichtbare Muster, z.B. durch Bildung einer Hemmzone um das Stanzloch. Findet keine Reaktion statt, so wächst die Kultur gleichmäßig auf der gesamten Agaroberfläche.

Bei jedem Test werden zusätzlich zu den Testlösungen Referenzlösungen verwendet, die sichere, vorhersehbare Reaktionen aufweisen.

2. TESTORGANISMUS

Als Testorganismus wird *Nitzschia*, NIVA-BAC 38 (Skulberg, et al., 1994) verwendet. Dieser Klon hat mehrere Eigenschaften, die ihn für den Test geeignet machen: Durch ihre Raphenstruktur stehen die *Nitzschia*-Zellen in engem Kontakt zu ihrer Umgebung; sie können auf festem Substrat wachsen und sich durch Kriechen fortbewegen, was ihnen die Möglichkeit gibt, sich von eventuellen schädlichen Einwirkungen fortzubewegen. Die Flucht der Zellen zeigt sich als gut sichtbare Hemmzone auf der Substratoberfläche.

3. VORGEHENSWEISE

- Kultivierung von *Nitzschia* in Vorkulturen.
- Gießen der Agarplatten.
- Aussaat der Testorganismen auf die Agarplatten.
- Herstellung der Testlösung.
- Ausstanzen der Löcher im Zentrum der Agarplatten und Zufügen der Testlösung.
- 4-6 Tage nach Zufügen der Testlösung Auswertung der Wirkung der Testlösung auf die Testorganismen:
Direkt visuell sowie mit Binokular und Mikroskop; Fotografieren der Agaroberfläche.

Eine schematische Übersicht über die Vorgehensweise zeigt Abb. 3.1.

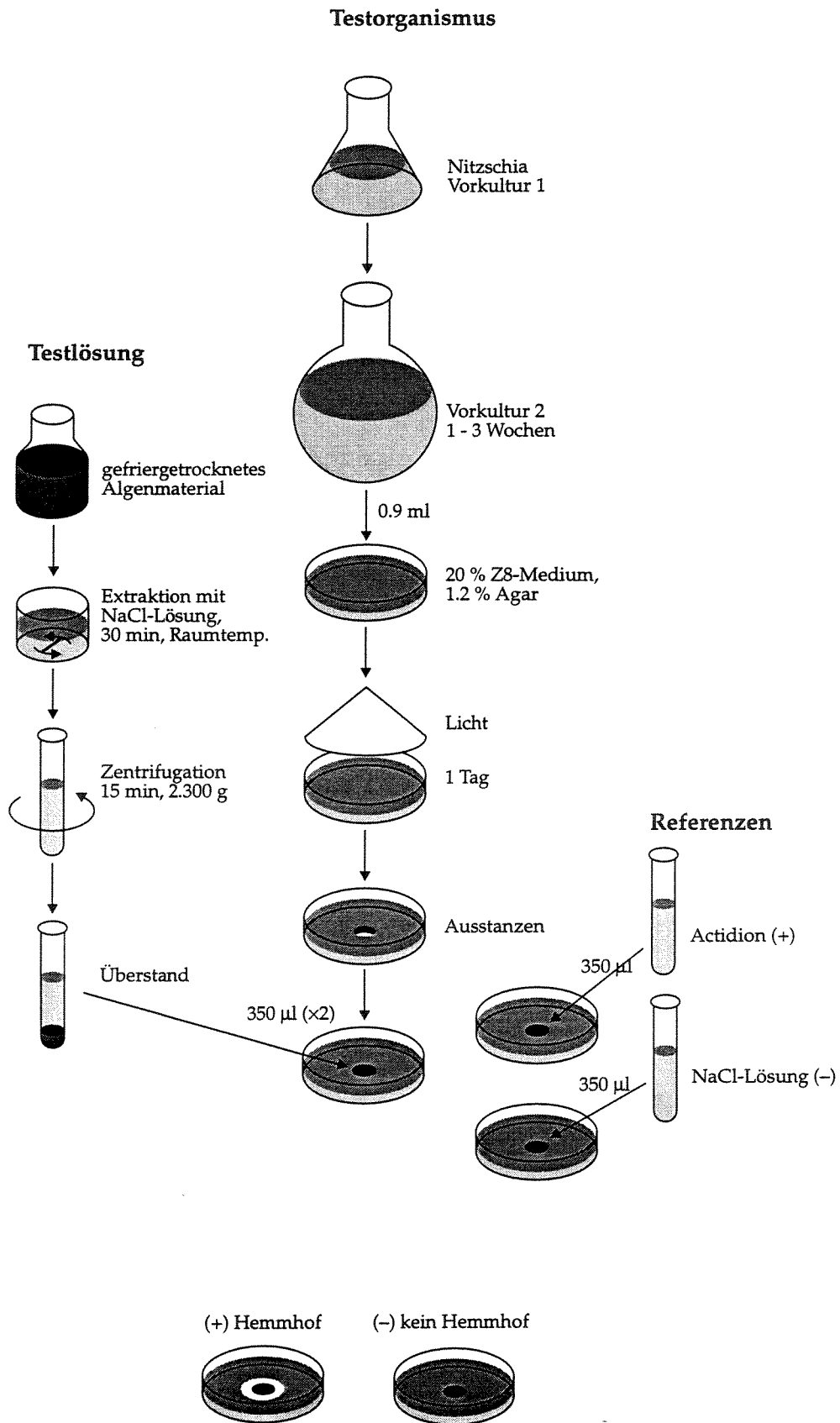


Abb. 3.1: Schematische Übersicht über die Vorgehensweise des *Nitzschia* - Biotests.

3.1 Kultivierung von *Nitzschia* in Vorkulturen

Vorkultur 1 (Stammkultur)

Nährmedium: 20 % Z8-Medium¹⁾ mit 1 ml Silikatlösung²⁾ / 1 Medium. (Siehe 4., S. 9).

Kultivierung in 100 ml Kolben, ohne Umrühren.

Wachstumsbedingungen: Temp.: 17 °C
Lichtintensität: 12 h 6 $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$; (Beleuchtung von oben);
12 h dunkel

Vorkultur 2

Nährmedium: 20 % Z8 mit 1 ml Silikatlösung / 1 Medium

Aus der Vorkultur 1 (Stammkultur) werden 5 ml der Vorkultur 1 in 1000 ml-Kolben mit frischem Medium gegeben und auf dem Schütteltisch kultiviert. Ist die Vorkultur 2 ohne Verunreinigung und frei von Klumpen, so kann sie nach 1-3 Wochen für den Test verwendet werden. (Ca 2×10^4 Zellen / ml Medium).

Wachstumsbedingungen: Temp.: 20 °C
Lichtintensität: 24 h 15-20 $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$ (Beleuchtung von oben)

3.2 Gießen der Agarplatten

Für die Anzucht von *Nitzschia* auf Nährlösung mit Agar werden Plastik-Petrischalen mit Rippen verwendet (Durchmesser 90 mm, Höhe 15 mm, KEBO, Norwegen). Die Petrischalen werden jeweils mit 30 ml Medium gefüllt.

Nährmedium: 20 % Z8 mit 1 ml Silikatlösung²⁾ / 1 Medium und 1.2 % Agar³⁾

- 1) 100 % Z8 Medium in 1000 ml Flaschen bereiten und bei 120 atm. 15 min. autoklavieren. Hierbei wird das verwendete Aqua dest. 10 min. mit CO₂ begast, um eine Ausfällung beim Autoklavieren zu vermeiden. Das autoklavierte 100 % Z8-Medium dient als Vorrat für weitere Testansätze (Lagerung bei Raumtemperatur).
- 2) Das auf Raumtemperatur abgekühlte Z8-Medium wird mit Aqua dest. zur weiteren Verwendung auf 20 % verdünnt, 1 ml Silikatlösung / 1 Medium sowie 1.2 % Agar zugefügt und autoklaviert.
- 3) Der noch flüssige Agar wird in 30 ml "Portionen" in Reagenzröhrchen mit Schraubdeckel gefüllt und abermals autoklaviert.
- 4) Der Inhalt eines jeden Reagenzröhrchens wird vor dem Erkalten des Agars in eine Petrischale gegossen. Um Verunreinigungen durch Bakterien oder Pilzsporen aus der Luft zu vermeiden: Beim Gießen des Agars Petrischalendeckel nur teilweise anheben. Stapelt man die gefüllten

Petrischalen übereinander, so vermeidet man Kondensbildungen. Agarplatten auf Raumtemperatur abkühlen lassen und zur Lagerung luftdicht verpacken und kühl stellen (Kühlschrank).

3.3 Aussaat und Kultivierung von *Nitzschia* auf Agarplatten

Auf die fertigen Agarplatten werden mit einer sterilen Pipette je 0.9 ml der *Nitzschia* Vorkultur 2 gegeben. Die Agaroberfläche ist so vollständig mit *Nitzschia*-Kultur bedeckt; bei Verwendung von mehr Flüssigkeit wirkt sich nachteilig aus, daß später Kulturflüssigkeit in das Stanzloch für die Testlösung fließt. Die Kultur durch vorsichtiges Neigen der Petrischalen gleichmäßig über die gesamte Agaroberfläche verteilen.

Die Agarkulturen wachsen 1 Tag, bevor die Löcher ausgestanzt und die Testlösung (Algenextrakt) zugefügt wird.

Wachstumsbedingungen: Temp: 20 °C
Lichtintensität: 24 h 9 $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$ (Beleuchtung von oben)

Die Lichtintensität von 9 $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$ stellte sich als optimal heraus. Bei höherer Lichtintensität werden weniger Pigmente ausgebildet, bei niedrigerer Lichtintensität wachsen die Zellen langsamer und die Auswertung wird verzögert.

3.4 Herstellung der Testlösung

25 mg gefriergetrocknetes Algenmaterial / ml NaCl-Lösung⁴⁾ wird unter schwachem Umrühren (Magnetrührer) bei Raumtemperatur 30 min. extrahiert. Die Lösung wird 15 min. bei 3 800 rpm, ca. 1800 g, zentrifugiert. Dies entspricht der Einstellung 8 der Jouan Tischzentrifuge (Type BB VVV, Societe Jouan, Saint-Herbain, Frankreich). Der Überstand wird abpipettiert und für den Test verwendet, das Sediment verworfen. Alternativ kann die Testlösung bei - 20 °C aufbewahrt werden.

3.5 Ausstanzen des Lochs und Zugabe der Testlösung

Nach einem Tag Wachstum der *Nitzschia* Kultur auf der Agarplatte wird im Zentrum der Petrischalen mit einem Korkbohrer (Durchmesser 11 mm) ein Loch ausgestanzt. Der Korkbohrer wird zuvor in Alufolie gewickelt und autoklaviert.

In das ausgestanzte Loch werden je Agarplatte 350 μl der Testlösung bzw. Referenzlösung⁵⁾ gegeben. Von der zu testenden Lösung werden je 2 Parallelproben angesetzt. Die zugesetzte Testlösung soll bis an die Oberfläche des Agars reichen - nicht überfließen lassen.

Nach 4-6 Tagen werden die Wirkungen der Testlösung auf das Wachstum von *Nitzschia* visuell ausgewertet (siehe 3.6).

Wachstumsbedingungen: Temp: 20 °C
Lichtintensität: 24 h 9 $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$ (Beleuchtung von oben)

Während des Wachstums von *Nitzschia* auf den Agarplatten kann sich die Austrocknung des Agars nachteilig auswirken. Um dies zu vermeiden, werden die Agarplatten unter eine durchsichtige Plastikbox gegeben (20 cm x 20 cm x 5 cm), in der Mitte ein kleines Becherglas mit Wasser (siehe Abb. 3.2). So erhält sich unter der Plastikbox eine Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Verwendung von Plastikboxen bietet den zusätzlichen Vorteil, durch Bedecken der Plastikboxen die Lichtintensität leicht regulieren zu können.

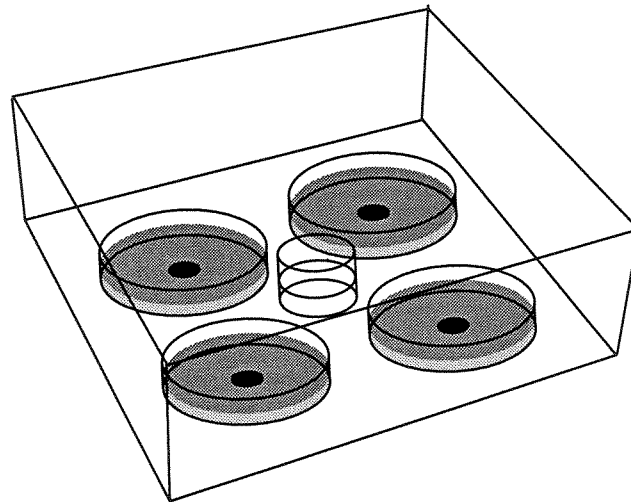


Abb. 3.2: Schematische Darstellung von 4 Agarplatten unter einer durchsichtigen Plastikbox (20 cm x 20 cm x 5 cm) mit einem kleinen Becherglas mit Wasser.

3.6 Auswertung des Tests

Die Auswertung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- Beschreibung eventueller Hemmzonen um das Stanzloch und Messen deren Durchmesser.
- Beschreibung des Zustands der Zellen mit Hilfe des Binokulars oder Mikroskops; sind die Zellen abgestorben, haben sie eine veränderte Struktur oder sind sie aus der Zone, in der die Testlösung wirkt, herausgewandert? In diesem Fall: Hat sich das Bewegungsmuster von *Nitzschia* verändert?
- Andere Effekte?
- Fotografieren der Agarplatten zur Dokumentation.

4. NÄHRLÖSUNGEN

1) 100 % Z8-Medium (Staub, 1961; modifiziert nach Kotai, 1972)

Stammlösungen		g / l Aqua dest	ml auf 1 l Aqua dest.
Lösung I:	NaNO ₃	46.7	
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5.9	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.5	10
Lösung II:	K ₂ HPO ₄	3.1	
	Na ₂ CO ₃	2.1	10
Lösung III:	Fe EDTA*		10
Lösung IV:	Spurstofflösung **		1

* Fe EDTA: 10 ml der FeCl₃ Lösung (2.8 g Fe Cl₃·6H₂O gelöst in 100 ml 0.1 N HCl) und 9.5 ml EDTA-Lösung (3.9 g EDTA-Na₂ gelöst in 100 ml 0.1 N NaOH) werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

** Spurstofflösung

Stammlösung:

Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.33	10
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.88	10
KBr	1.2	10
KJ	0.83	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.87	10
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1.55	10
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	1.46	10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.25	10
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	1.98	10
Cr(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.41	10
V ₂ O ₅	0.089	10
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	4.74	10
H ₃ BO ₃	3.1	100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.23	100

2) Silikatlösung: 14.2 g Na₂SiO₃·9H₂O / l Aqua dest.

3) Agar: DIFCO Bacto-Agar, 0.140-01. (Detroit Michigan, USA).

4) NaCl-Lösung: 9 g NaCl / l Aqua dest.

5) Referenzlösungen: Actidion (0.5 mg / ml Aqua dest.), ergibt einen Hemmhof (+)
NaCl -Lösung, ergibt keinen Hemmhof (-)

5. PRAKTISCHES BEISPIEL

5.1 Testlösungen

- *Microcystis aeruginosa* Kütz., aus der Wasserblüte September 1988 des Sees Frøylandsvatn, Rogaland, isoliert (Skulberg, 1979).

Konzentrationen:

Standard Konzentration	25 mg gefriergetrocknetes Algenmaterial / ml NaCl-Lösung ⁴⁾
Halbe Konzentration	12.5 mg gefriergetrocknetes Algenmaterial / ml NaCl-Lösung

- *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb., NRC-44-1, Kanada

Konzentration:

Standard Konzentration	25 mg gefriergetrocknetes Algenmaterial / ml NaCl-Lösung
------------------------	--

Referenzlösung⁵⁾

- NaCl- Lösung. Keine Hemmhofbildung (-)
- Actidion. Hemmhofbildung (+)

5.2 Ergebnis

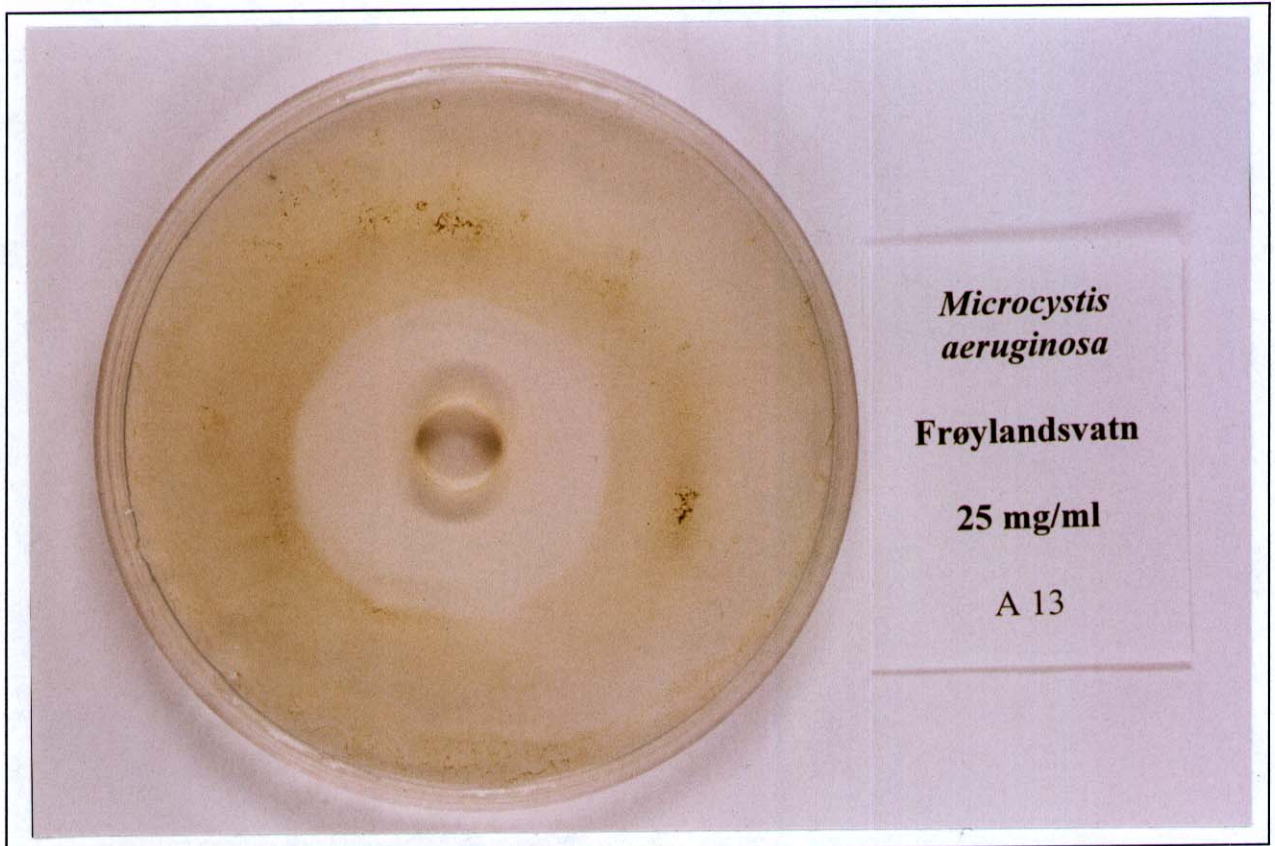
5 Tage nach Zugabe der Testlösung wurde der Versuch ausgewertet und die Agarplatten fotografiert (siehe Abb. 5.1 auf den folgenden Seiten).

Hemmhofbildung (+, -) und Durchmesser der Hemmhöfe

• <i>Microcystis aeruginosa</i> , Frøylandsvatn, Standard Konzentration	(+)	3.7 cm
• <i>Microcystis aeruginosa</i> , Frøylandsvatn, halbe Konzentration	(+)	2.8 cm
• <i>Anabaena flos-aquae</i> , Standard Konzentration	(-)	0 cm
• NaCl-Lösung	(-)	0 cm
• Actidion	(+)	3.3 cm

Für die Testlösung aus *Microcystis aeruginosa* (aus dem Frøylandsvatn) sowie für weitere, hier nicht aufgeführte Testlösungen zeigte sich, daß der Durchmesser der Hemmhöfe von der Konzentration der Testlösung abhing. In allen Versuchswiederholungen bewirkte Actidion eine Hemmhofbildung (+), NaCl-Lösung keine Hemmhofbildung (-).

Es zeigte sich, daß Algenextrakte auch in der Weise wirken können, daß *Nitzschia* sich zur Testlösung hin konzentriert (z.B. *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix*, hier nicht aufgeführt).

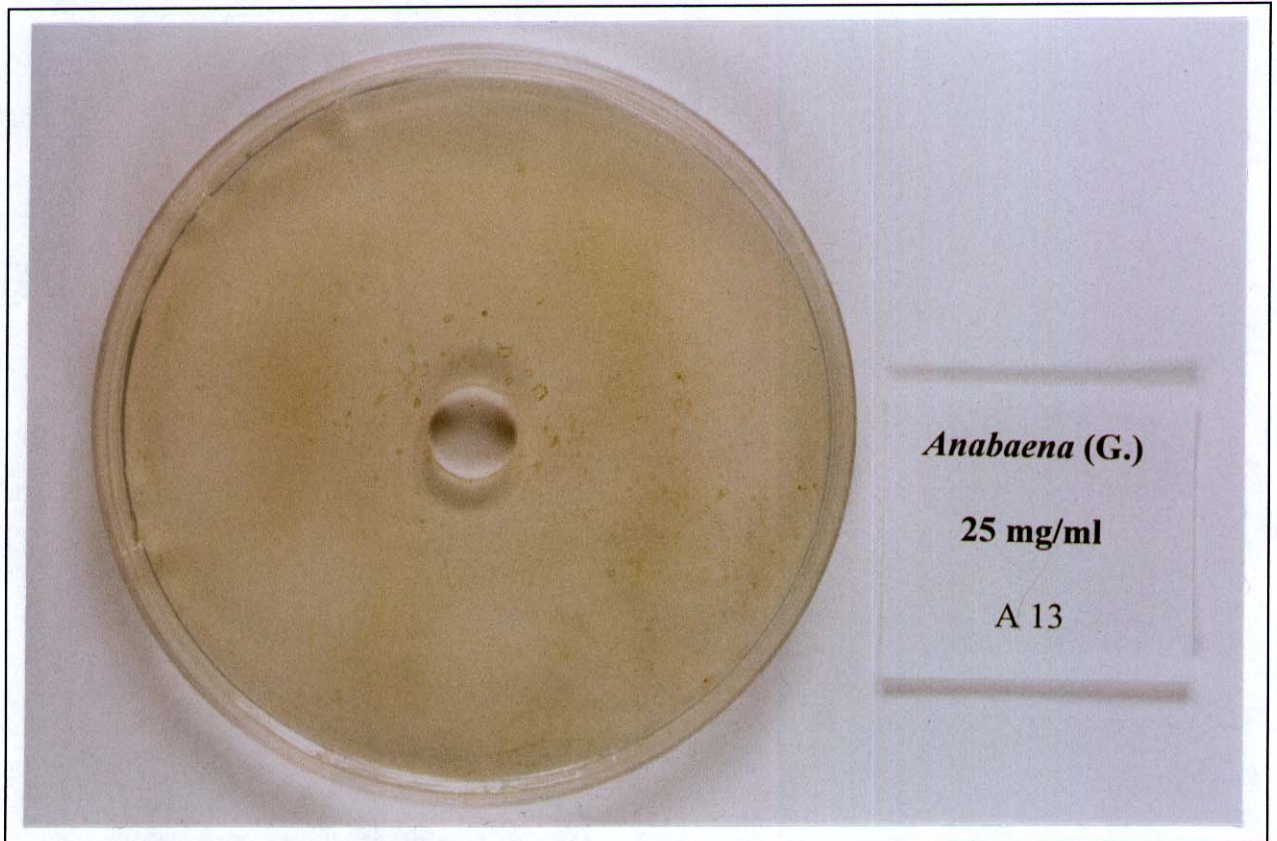


a) *Microcystis aeruginosa*, Standard Konzentration



b) *Microcystis aeruginosa*, halbe Konzentration

Abb. 5.1: Wirkung der Testlösungen auf das Wachstum und die Verteilung von *Nitzschia*



c) *Anabaena flos-aquae*, Standard Konzentration



d) Actidion

Abb. 5.1, Forts.: Wirkung der Testlösungen auf das Wachstum und die Verteilung von *Nitzschia*

6. ZUSAMMENFASSUNG DER ANMERKUNGEN

- Beim Wachstum von *Nitzschia* ist die Lichtintensität von $9 \mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$ von Vorteil. Die Zellen sind so stärker pigmentiert als bei höherer Lichtintensität und somit ist eine Hemmhofbildung besser zu erkennen. Bei einer weiteren Reduzierung der Lichtintensität wachsen die Zellen langsamer und die Auswertung des Tests verzögert sich.
- Um ein Austrocknen der beimpften Agarplatten zu verhindern, empfiehlt es sich, jene unter eine durchsichtige Plastikbox mit einem Becherglas mit Wasser zu geben.
- In manchen Versuchsansätzen war es schwierig zu erkennen, ob auf der Agarplatte ein Hemmhof gebildet wurde. Der Hemmhof kann undeutlich sein oder die Zellen klumpen innerhalb der Zone um das Stanzloch. Oft war die Wirkung der Testlösung deutlicher, wenn bei einer Versuchswiederholung die doppelte Konzentration verwendet wurde.
- Ein Zeitraum von 5 Tagen bis zum Registrieren eines möglichen Effekts (Hemmhof) erwies sich als sinnvoll. Zum einen zeigt sich bereits deutlich eine mögliche Wirkung des Teststoffes, zum anderen wird der Test nicht wesentlich durch natürlichen Zelltod der Testorganismen oder evt. bakterielle Verunreinigungen beeinflusst.

7. LITERATUR

- Kotai, J. (1972). Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research, Oslo. Publication B-11/69. 5 pp.
- Staub, R. (1961). Ernährungsphysiologisch - autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. Schweiz. Z. Hydrol. **23** (1): 82-198. (p. 116).
- Skulberg, O.M. (1968). Studies on eutrophication of some Norwegian inland waters. Mitt. Internat. Verein. Limnol. **14**: 187-200.
- Skulberg, O.M. (1979). Giftvirkninger av blågrønnalger - første tilfelle av *Microcystis*-forgiftning registrert i Norge. Toxic effects of blue-green algae - first case of *Microcystis*-poisoning reported from Norway. Tema-rapport 4. Norsk institutt for vannforskning, Oslo. (English summary).
- Skulberg, O.M., Enzensberger, T., and Skulberg, R. (1994). Alger i planteskoler og veksthusgartnerier. En orienterende studie. Norsk institutt for vannforskning, Oslo. ISBN 82-577-2522-6.

Norsk institutt for vannforskning

Postboks 173 Kjelsås
0411 Oslo

Telefon: 22 18 51 00
Telefax: 22 18 52 00

Bei Bestellung bitte Laufnummer
angeben 3539-96

ISBN 82-577-3086-6