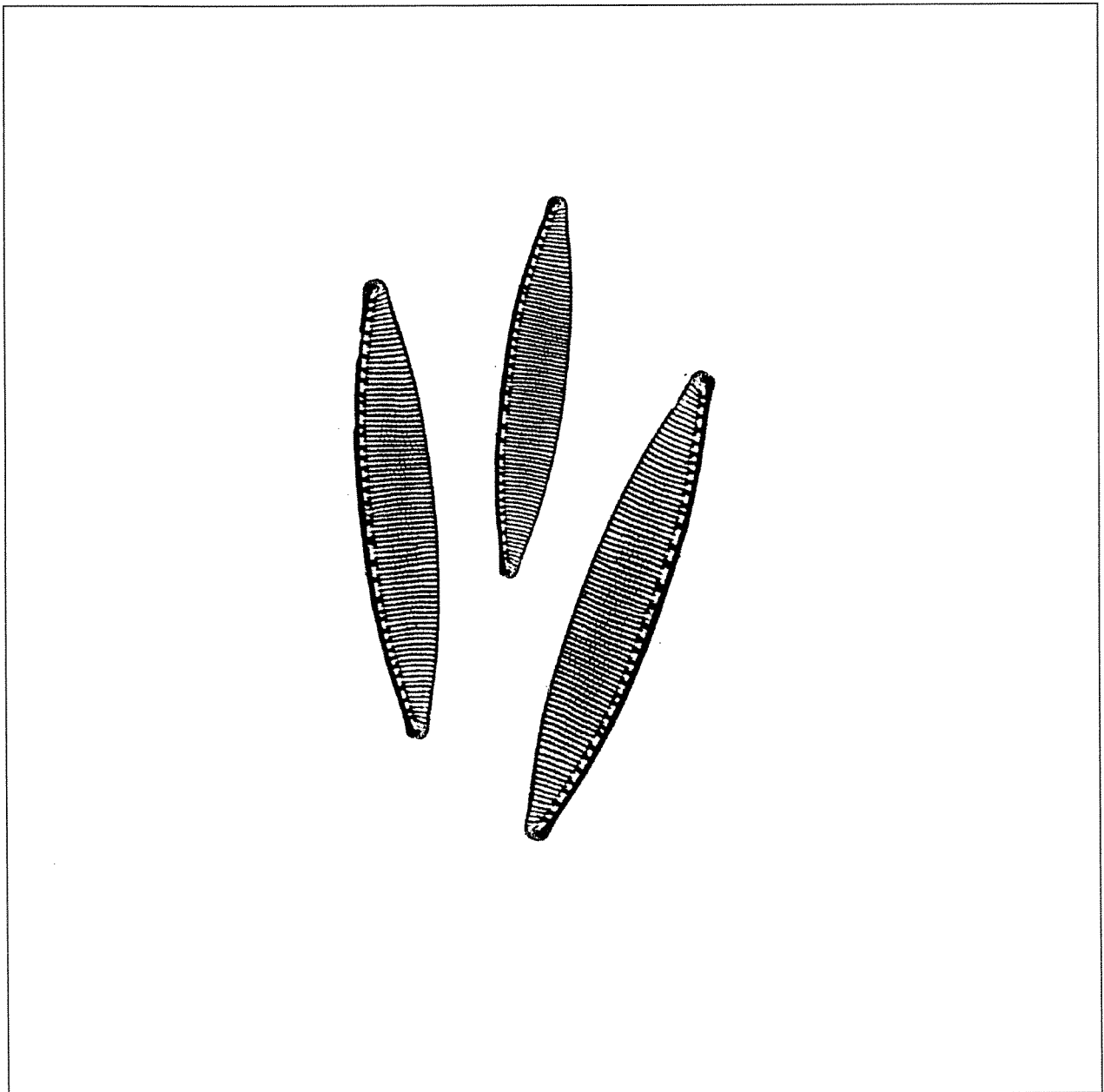


RAPPORT LNR 3540-96

**F**ramgangsmåte ved  
utføring av *Nitzschia*-biotest  
til påvising av  
blågrønnalgetoksiner



**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

Tittel Framgangsmåte ved utføring av <i>Nitzschia</i> -biotest til påvising av blågrønnalgetoksiner.	Løpenr. (for bestilling) 3540-96	Dato 1997.01.07
	Prosjektnr. Undernr. 93404	Sider Pris 13
Forfatter(e)  Heike Kiefer Tone Jøran Oredalen Olav M. Skulberg	Fagområde Vassdrag	Distribusjon
	Geografisk område	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Norsk institutt for vannforskning (NIVA).	Oppdragsreferanse
---	-------------------

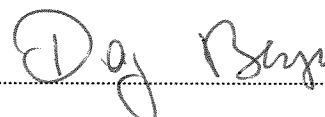
<p>Sammendrag</p> <p>Rapporten inneheld ein gjennomgang av framgangsmåten for biotestmetode til påvising av økologiske effektar av blågrønnalgetoksiner. Testorganismen som er nytta er ein klon av den pennate kiselalgeslekta <i>Nitzschia</i>. Testen vert utført på fast medium, der <i>Nitzschia</i>-cellene vert jamnt fordelt på overflata. Teststoffet, ekstrakt frå blågrønnalger, vert sett til i ein brønn i senteret av agarskåla. Avhengig av eigenskapane til dei verksame stoffa som diffunderar ut i mediet, vil algecellene kunne reagere med forflytting, endra vekst eller celledød. Reaksjonane gjev seg utslag som synlege felt med høg eller låg cellekonsentrasjon av testorganismen.</p>
--

<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Nitzschia</i></li> <li>2. biotest</li> <li>3. blågrønnalgetoksiner</li> <li>4.</li> </ol>	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <i>Nitzschia</i></li> <li>2. biotest</li> <li>3. cyanotoxins</li> <li>4.</li> </ol>
---	--



Prosjektleder

ISBN 82-577-3087-4



Forskningsjef

**NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING**

**Oslo**

**93404**

**Framgangsmåte ved utføring av *Nitzschia* - biotest til  
påvisning av blågrønnalgetoksiner**

**Oslo, 6. januar 1997**

**Saksbehandler:**

**Olav Skulberg**

**Medarbeidere:**

**Heike Kiefer  
Tone Jøran Oredalen  
Randi Skulberg  
Bjørn Faafeng**

**For administrasjonen:**

**Dag Berge**

## **FORORD**

*Utforskningen av blågrønnalgenes toksinproduksjon sammen med toksinenes stofflige og biologiske natur er avhenging av egnede eksperimentelle metoder. De aktuelle sekundære metabolitter omfatter flere kategorier av kjemiske forbindelser med ulike fysiologiske og økologiske virkninger. Det er nødvendig å kunne benytte et utvalg av biotester for å belyse de kausale sammenhenger som eksisterer.*

*NIVA har med grunnlag i erfaringer som er fremkommet fra felt- og laboratoriestudier, funnet at kiselalger av slekten Nitzschia reagerer følsomt på stoffskifteprodukter av toksisk natur produsert av blågrønnalger. I dette skriftet beskrives en biotestmetode basert på kiselalgen NIVA-BAC 38 til påvisning og registrering av giftvirkninger knyttet til blågrønnalgetoksiner.*

*Oslo, 10. september 1996*

*Olav Skulberg*

## INNHALD

<b>1. PRINSIPP</b>	<b>3</b>
<b>2. TESTORGANISMEN</b>	<b>3</b>
<b>3. FRAMGANGSMÅTE</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Kultivering av <i>Nitzschia</i> i forkulturar</b>	<b>5</b>
<b>3.2 Tillaging av agarskåler</b>	<b>5</b>
<b>3.3 Utsåing og inkubering av <i>Nitzschia</i></b>	<b>6</b>
<b>3.4 Framstilling av testløysing</b>	<b>6</b>
<b>3.5 Utstansing av brønnar i agaren - tilsetting av testløysing</b>	<b>6</b>
<b>3.6 Registrering av effektar</b>	<b>7</b>
<b>4. UTSTYR OG LØYSINGAR</b>	<b>8</b>
<b>5. PRAKTISK EKSEMPEL</b>	<b>10</b>
<b>5.1 Testløysingar</b>	<b>10</b>
<b>5.2 Resultat</b>	<b>10</b>
<b>6. OPPSUMMERANDE ERFARINGAR</b>	<b>13</b>
<b>7. LITTERATUR</b>	<b>13</b>

## 1. PRINSIPP

Ein tett kultur av kiselalgen *Nitzschia* sp., vert sådd ut på fast medium (agar) i petriskåler. Etter at algecellene har fått tid til å etablere seg på overflata av mediet i eit døgn, vert det stansa ut ein brønn i senteret av kvar skål. Brønnen vert fylt med testløyising, td. algekonsentrat, som gradvis vil diffundere ut i agaren. Dei verksame stoffa vil komme i kontakt med testorganismen og bli tatt opp i cellene sammen med næringsstoffa frå mediet. Avhengig av eigenskapane til dei verksame stoffa, vil algecellene kunne reagere med forflytting, endra vekst eller celledød. Desse reaksjonane viser seg som synlege mønster på substratet etter 4-6 døgn. Manglande utslag viser seg ved jamn vekst av kulturen på agaroverflata.

Ved kvar test nyttast referanseløysingar, i tillegg til testløyisinga, som gjev sikre, føreseielege utslag.

## 2. TESTORGANISMEN

*Nitzschia*, NIVA-BAC 38 (Skulberg et al., 1994), vert nytta som testorganisme. Klonen har fleire veleigna eigenskapar for denne typen testar. Gjennom sin raphe-struktur står cellene i nær kontakt med omgjevnaden. Dei kan leva på fast substrat, og har krypande rørsler som gjer dei i stand til å forflytte seg frå eventuelle skadelege påverknader. Systematiske celle-forflyttingar vil avteikne seg som lett synlege felt med høg eller låg cellekonsentrasjon på substratoverflata.

## 3. FRAMGANGSMÅTE

Ein skjematisk oversikt over framgangsmåten er vist i figur 3.1. Hovudtrekka i teksten er:

- Kultivering i forkulturar.
- Tillaging av agarskåler.
- Utsåing på agar og inkubering av testorganismen.
- Framstilling av testløyising.
- Utstansing av brønnar i agaren og tilsetjing av testløyising.
- Registrere effekten av testløyisinga på testorganismen, 4-6 døgn etter tilsetjing: visuelt direkte, samt gjennom lupe og mikroskop; fotografering av agaroverflata.

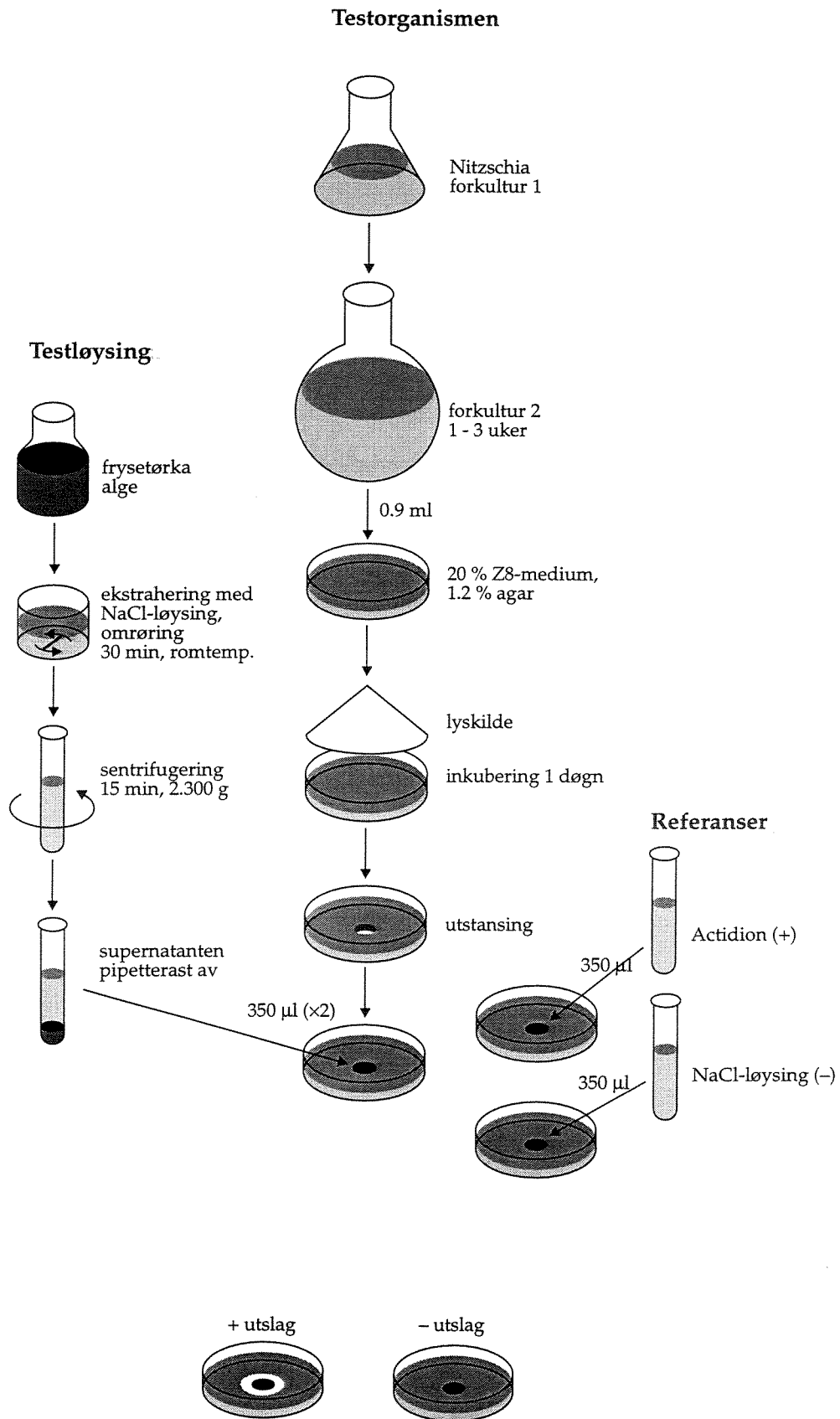


Fig. 3.1: Skjematisk oversikt over framgangsmåten

### 3.1 Kultivering av *Nitzschia* i forkulturar

#### Forkultur 1 (Stamkultur)

Vekstmedium: 20 % Z8-medium<sup>1)</sup> med 1 ml silikatløysing<sup>2)</sup> / l medium. (Se 4., side 9).

Kultivering i 100 ml kolbar, utan omrøring.

Inkuberings-tilhøve: Temp.: 17 °C  
Lys: 12 timar 6 µM / m<sup>2</sup> s; 12 timar mørk

#### Forkultur 2

Vekstmedium: 20 % Z8-medium med 1 ml silikatløysing / l medium

Overføring av 5 ml forkultur 1 (stamkultur) til friskt medium i 1000 ml kolbar på gyngbord. Forkultur 2 kan nyttast til test etter 1-3 veker, når ein ser at den veks utan ureiningar og klumpar. (Ca 2 x 10<sup>4</sup> celler / ml medium).

Inkuberings-tilhøve: Temp.: 20 °C  
Lys: 24 timer 15-20 µM / m<sup>2</sup> s (overlys)

### 3.2 Tillaging av agarskåler

For dyrking av *Nitzschia* på agar er det nytta eingongs-petriskåler med ribber, med ein diameter på 90 mm og ei høgd på 15 mm (KEBO, Norge). Kvar skål fyllast med 30 ml medium.

Vekstmediet: 20 % Z8-medium med 1 ml silikatløysing / l medium og 1.2 % agar<sup>3)</sup>

#### Tillaging:

- 1) Lag opp 100 % Z8-medium i større flasker (td. 1000 ml), og autoklaver desse ved 120 ato. i 15 min. Dest. vatnet som nyttast i mediet bør boblast med CO<sub>2</sub> i ca. 10 min. før tilsetting, for å unngå fellingar under autoklavinga. Dersom ein har laga rikeleg med 100 % Z8-medium, kan ein seinare gå direkte til pkt. 2:
- 2) Avkjøl flaskene til det er mogleg å ta på dei med bare hender. Fortynn så det mediet som skal nyttast vidare til 20 % med dest. vatn, tilsett 1 ml silikatløysing / l medium og til slutt 1.2 % agar. Autoklaver.
- 3) Mål opp "porsjonar" på 30 ml ferdig varm agar, og overfør desse til reagensrør med skrulokk. Autoklaver på nytt.
- 4) Kvant reagensrør hellast over i ei petriskål. Dette må gjerast før agaren vert så avkjøla at den tek til å stivne. For å unngå bidrag av bakteriar og sporer frå lufta: Ikkje ta lokket av skålene heilt av, bare lag ei tilstrekkeleg "glippe" til å få gjort overføringa. Eit tips er å stable agarskålene oppå kvarandre under avkjøling, for å unngå kondens under lokka og "nedfall" på agaren. Avkjøl skålene til romtemperatur før dei settast på kjølerom. Skålene må oppbevarast innpakka.



### 3.3 Utsåing og inkubering av *Nitzschia*

For dyrking av *Nitzschia* på agar er 0.9 ml av forkultur 2 til kvar agarskål ei passende mengde. Overflata skal vera dekt, men ikkje flyte. Kulturen fordelast mest mogleg utover ved overføringa med steril automatpipette. Deretter hellast skåla fram og tilbake, evt. ristast forsiktig, til kulturen er jamnt fordelt over heile agaroverflata.

Kulturskålene får vekse 1 døgn før utstansing av brønnar og tilsetning av testløysing (algeekstrakt).

Inkuberingstilhøve:   Temp: 20 °C  
                               Lys: 24 timar 9  $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$  (overlys)

Resultatet vert best ved låg lysintensitet, fordi pigmenteringa av cellene vert sterkare og evt. celleopphopingar tydelegare.

### 3.4 Framstilling av testløysing

Testløysinga tek utgangspunkt i 25 mg frysetørka algemateriale / ml NaCl-løysing<sup>4)</sup>. Ekstraksjonen skjer under svak omrøring (magnetrorar) ved romtemperatur i 30 min. Løysinga sentrifugerast deretter i 15 min. ved 3 800 rpm (ca. 1800 g), som tilsvarar innstilling 8 på Jouan bordsentrifuge (Type BB VVV, Societe Jouan, Saint-Herblain, Frankrike). Supernatanten pipetterast av, og brukast vidare for tilsetning i agarbrønnane. Alternativt kan den frysast ned for evt. seinare bruk.

### 3.5 Utstansing av brønnar i agaren - tilsetning av testløysing

Etter 1 døgn vekst av *Nitzschia* på agarskålene, stansast det ut ein brønn i senteret på kvar agar-skål med eit korkbor (diameter 11 mm). Korkboret er på førehand pakka inn i aluminiumsfolie og autoklavert.

350  $\mu\text{l}$  testløysing eller referanseløysingar<sup>5)</sup> settast til i kvar brønn. Det nyttast alltid 2 parallellar av den ukjente testløysinga. Tilsettinga skal stå kant-i-kant med agaroverflata - ikkje flyte utover.

Skålene skal nå stå til inkubering i 4-6 døgn før visuell registrering av effekten på vekst av *Nitzschia*.

Inkuberingstilhøve:   Temp: 20 °C  
                               Lys: 24 timar 9  $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$  (overlys)

Eit problem kan vera uttørking av agaren under inkubering. Eit tiltak som har vist seg å vera vellukka, er å plassere skålene under gjennomsiktige plastboksar (20 cm x 20 cm x 5 cm) sammen med små begerglas med vatn (sjå fig. 3.2). Dette er nok til å halde ein luftfukt på ca. 50 %. Lysstyrken kan også lett regulerast på dette viset, fordi boksane er lette å dekke til dersom ein treng å tilpasse innstrålinga.

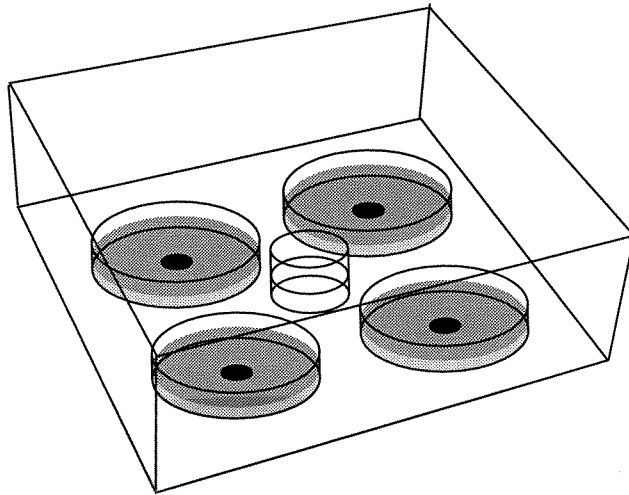


Fig. 3.2: Skjematisk framstilling av 4 agarskåler plassert under ein gjennomsiktig plastboks (20 cm x 20 cm x 5 cm) sammen med eit begerglas vatn.

### 3.6 Registrering av effektar

Registreringa skjer på ulike nivå:

- Skildre evt. ringsoner rundt brønnen, og måle diameteren på desse.
- Sjå på celletilstanden i lupe; er cellene døde, er strukturen endra, eller har dei emigrert ut av sona som er påverka av testløyising? I så fall: Er rørslemønsteret endra?
- Andre effektar?
- Fotograferer agarskålene for dokumentasjon.

## 4. UTSTYR OG LØYSINGAR

### *Utstyr:*

#### *Framstilling av algeekstrakt:*

hanskar

begerglas (~25 ml) for ekstraksjon av testløyising

labvekt

magnetrorar(ar)

reagensror (10-15 ml)

sentrifuge

oppsugingspipette

dramsglas m/lokk (til ferdig ekstrakt)

automatpipette (0-1 ml)

pipettespissar

petriskåler med ribber (diameter 90 mm, høgd 15 mm, KEBO, Norge)

reagensror med skrukork (~50 ml)

målesylinder (>30 ml)

autoklav

korkbor (diameter 11 mm)

lysmålar (Phillips TLM64W/33RS)

bordflate i vater

lyskjelde med jamn fordeling

**Løysingar:**

1) 100 % Z8-medium (Staub, 1961; modifisert Kotai, 1972)

Stamløysingar		g / l dest. vatn	Tilsetn. til dest. vatn ml / l
løysing I:	NaNO <sub>3</sub>	46.7	
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5.9	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5	10
løysing II:	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.1	
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.1	10
løysing III:	Fe EDTA*		10
løysing IV:	Sporstoff**		1

\* Fe EDTA: 10 ml fra FeCl<sub>3</sub> løysing (2.8 g Fe Cl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O løyst i 100 ml 0.1 N HCl) og 9.5 ml av EDTA-løysing (3.9 g EDTA-Na<sub>2</sub> løyst i 100 ml 0.1 N NaOH) blandast og fyllast opp til 1000 ml dest.vatn.

**\*\* Sporstoff**

Stamløysing:

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

2) Silikatløysing: 14.2 g Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O / l dest. vatn

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

4) NaCl-løysing: 9 g NaCl / l dest. vatn

5) Referanseløysingar: Actidion (0.05 mg / ml dest. vann), gjev positivt utslag (+)  
NaCl -løysing, gjev ikkje utslag (-)

## 5. PRAKTISK EKSEMPEL

### 5.1 Testløysingar

- *Microcystis aeruginosa* Kütz. frå Frøylandsvatn i Rogaland, vassblomst 14. september 1988 (Skulberg, 1979).

Konsentrasjon:

Standard dosering 25 mg frysetørka algemateriale / ml NaCl-løysing<sup>4)</sup>

Halv dosering 12.5 mg frysetørka algemateriale / ml NaCl-løysing

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

Konsentrasjon:

Standard dosering 25 mg frysetørka algemateriale / ml NaCl-løysing

Referanseløysingar<sup>5)</sup>

- NaCl-løysing. Forventing om manglande utslag (-)
- Actidion. Forventing om positivt utslag (+)

### 5.2 Resultat

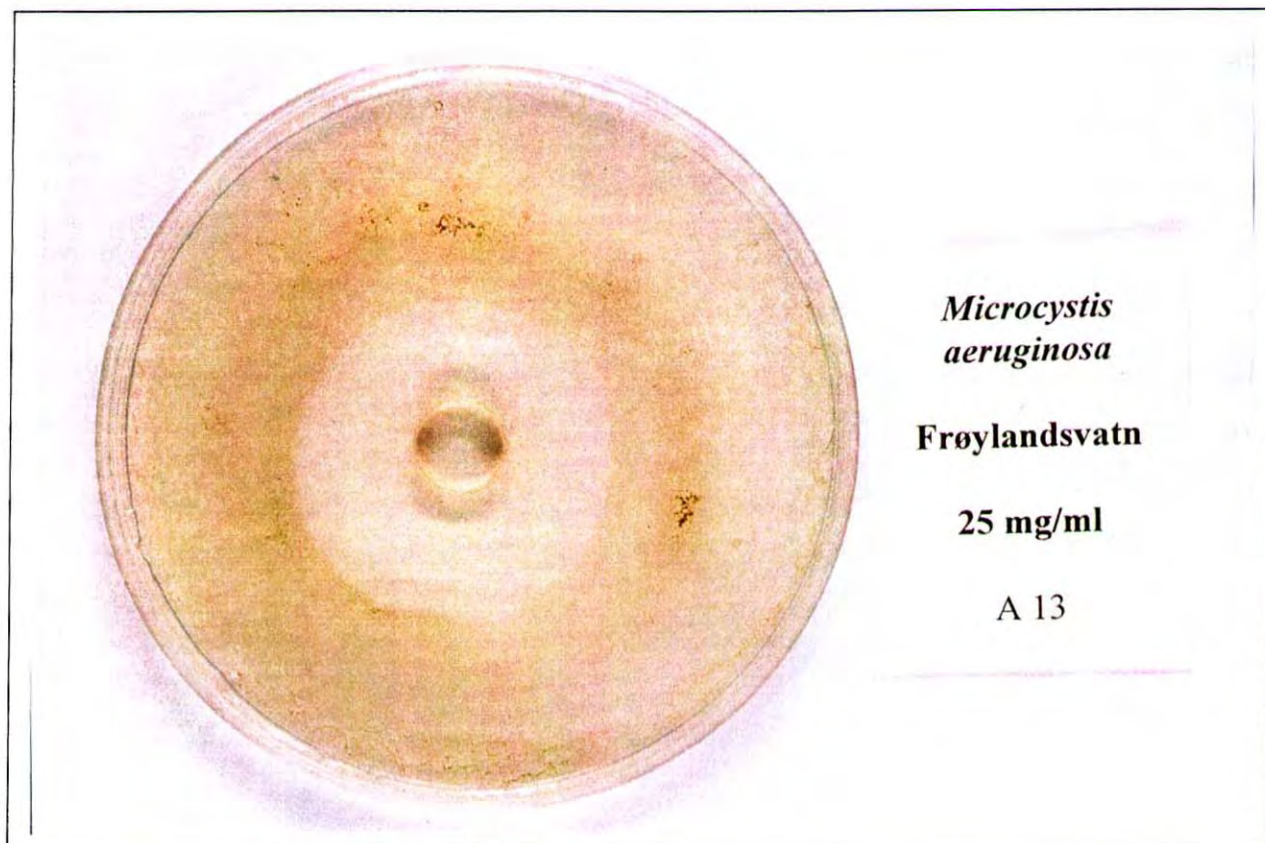
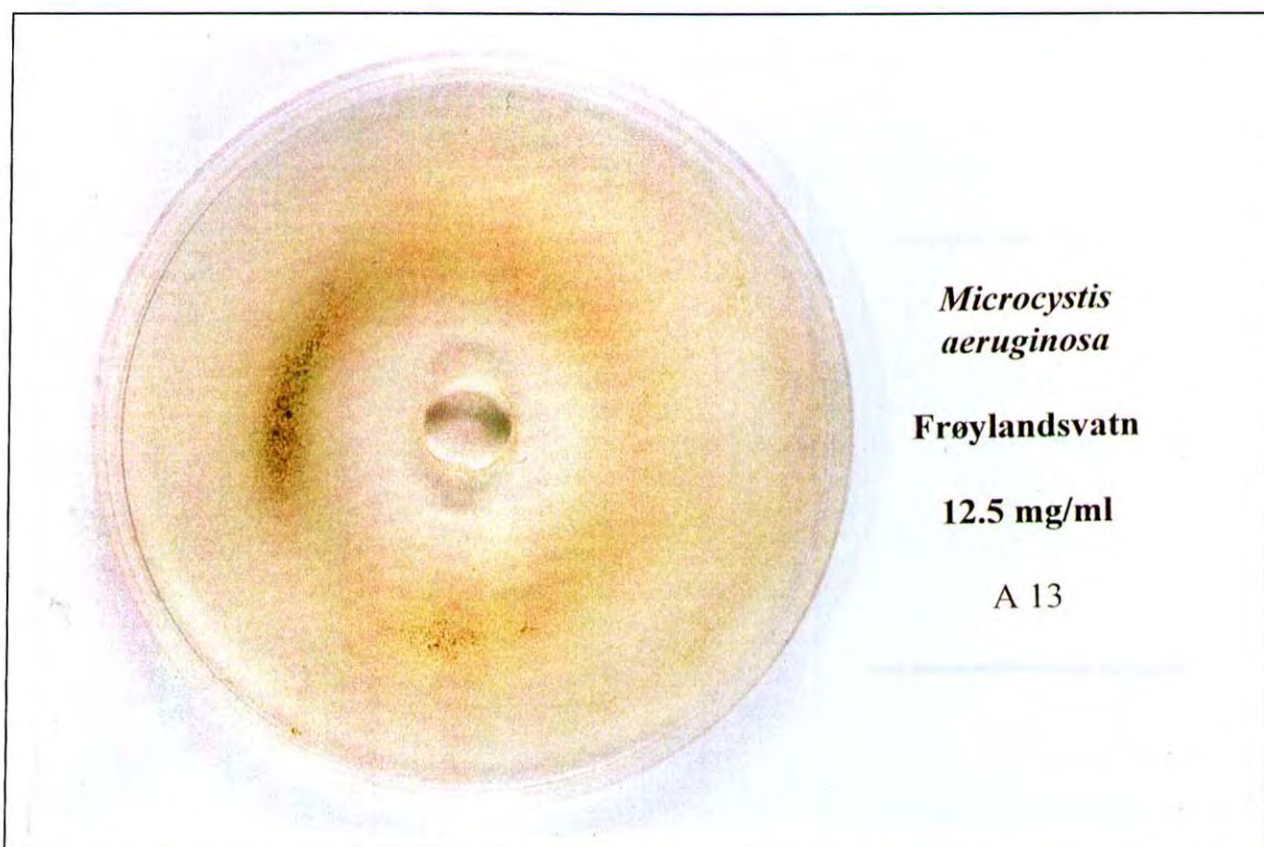
Avlesing og fotografering skjedde etter inkubering i 5 døgn. Resultatet er vist i figur 5.1 på neste side.

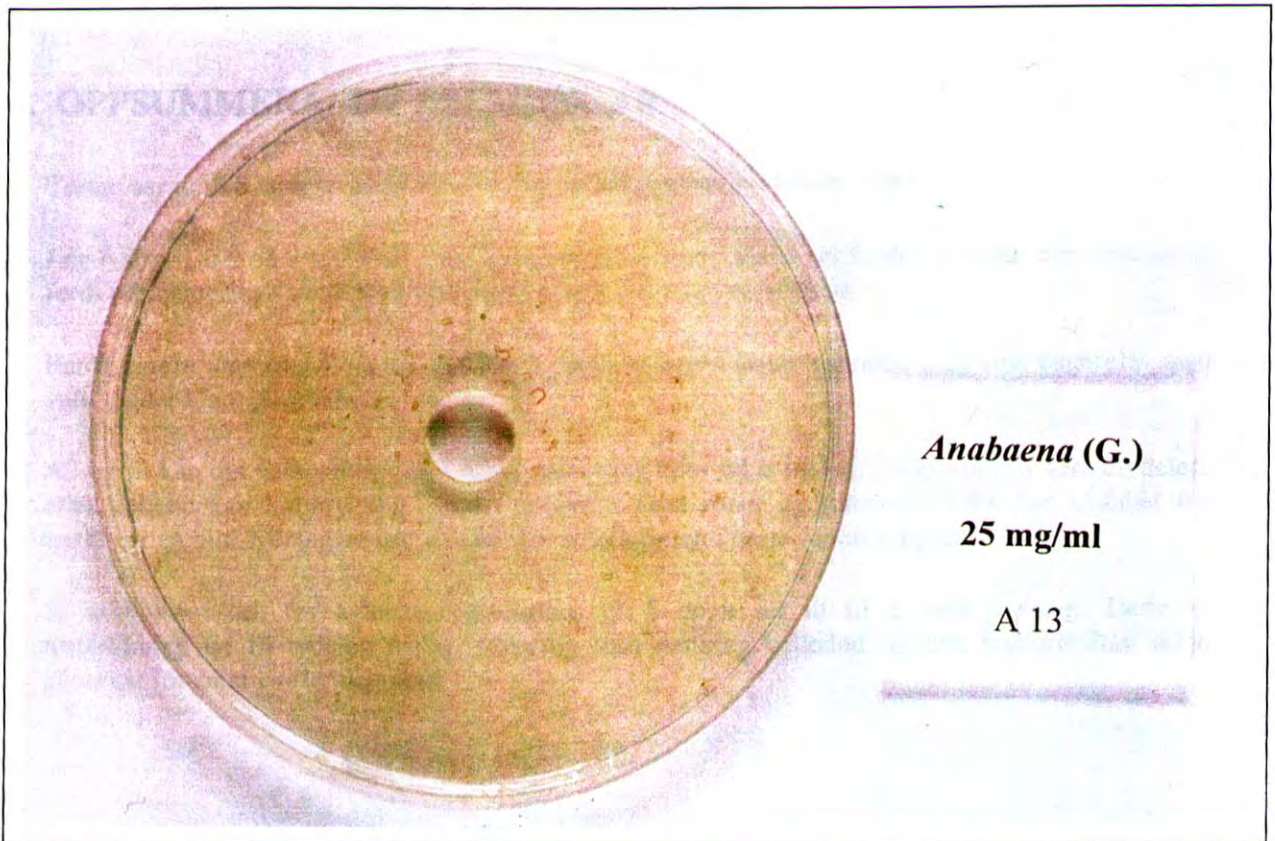
Utslag (+, -) og diameter ringsoner

- |  |     |        |
|--|-----|--------|
| • <i>Microcystis aeruginosa</i> , Frøylandsvatn, standard dose | (+) | 3.7 cm |
| • <i>Microcystis aeruginosa</i> , Frøylandsvatn, halv dosering | (+) | 2.8 cm |
| • <i>Anabaena flos-aquae</i> , standard dose                   | (-) | 0 cm   |
| • NaCl-løysing   | (-) | 0 cm   |
| • Actidion   | (+) | 3.3 cm |

Resultatet for *Microcystis aeruginosa* tyder på at doseringa gjev direkte utslag på diameteren av ringsonene. Denne sammenhengen er vist for fleire typar ekstrakt i fleire forsøksoppsett. I alle forsøk har actidion gitt positivt utslag, og NaCl vist manglande utslag.

Det er også vist at enkelte ekstrakt kan ha ein tiltrekkande effekt på *Nitzschia*, med opphoping av algeceller tett inntil brønnen (*Oscillatoria agardhii* var. *isothrix*, ikkje vist i eksempelet)

a) *Microcystis aeruginosa*, standard doseb) *Microcystis aeruginosa*, halv doseFig. 5.1: Fotografi av effekten av testløyisingane på vekst og fordeling av *Nitzschia*, etter 5 døgn.



c) *Anabaena flos-aquae*, standard dose



d) Actidion

Fig.5.1 forts.: Fotografi av effekten av testløysingane på vekst og fordeling av *Nitzschia*, etter 5 døgn.

## 6. OPPSUMMERANDE ERFARINGAR

- Testen ser ut til å vera lovande for påvising av blågrønnalgetoksiner i vatn.
- *Låg lysintensitet* på 9  $\mu\text{M} / \text{m}^2 \text{ s}$  ved inkubering av agarskålene ein fordel. Utslaga vert tydelegare fordi pigmenteringa av cellene vert sterkare enn ved høg lysintensitet.
- For å *hindre uttørring* fungerer der bra å plassere agarskålene, sammen med små begerglas med vatn, under klare plastboksar.
- Av og til kan det vera vanskeleg å registrere utslag eller ikkje utslag. Ringsona kan vera utydeleg, eller cellene kan klumpe seg relativt kraftig i sona rundt agarbrønnen. Ofte har utslaget for testløyisinga blitt tydelegare ved å doble konsentrasjonen i neste forsøksoppsett.
- Ei inkubasjonstid, før avlesing/registrering, på 5 døgn ser ut til å vera høveleg. Dette er tilstrekkeleg tid til tydeleg utslag, samtidig som naturleg celledød og evt. bakterie-åtak ikkje påverkar forsøket i vesentleg grad.

## 7. LITTERATUR

- 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., & 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

Ved bestilling av rapporten,  
oppgi løpenummer 3540-96

ISBN 82-577-3087-4