



Upptag och förekomst av microcystiner i rädisa och sallad vid bevattning med sjövatten som innehåller cyanobakterier

Examensarbete 20 p.

av

David Lindgren

Institutionen för Miljöanalys
SLU
Box 7050 750 07 Uppsala

Handledare: Eva Willén

Upptag och förekomst av microcystiner i rädisa och
sallad vid bevattning med sjövatten som innehåller
cyanobakterier

Upplaga: 50 ex.
©Institutionen för Miljöanalys
ISSN 1403-977X

Innehållsförteckning

| | Sida |
|---|------|
| Innehållsförteckning | 1 |
| Abstract | 2 |
| 1. Inledning | 4 |
| 1.1 Allmänt | 4 |
| 1.2 Vilka gifter producerar cyanobakterier – och varför? | 5 |
| 1.3 Massutveckling av cyanobakterier – regleringsmekanismer | 7 |
| 1.4 Situationen i Sverige | 8 |
| 1.5 Microcystiners effekter på djur och växter | 9 |
| 1.5.1 Effekter på djur och människor | 9 |
| 1.5.2 Effekter på växter | 10 |
| 1.6 Målsättning | 12 |
| 2. Material och metoder | 12 |
| 2.1 Provtagning | 12 |
| 2.2 Växtmaterial, odling och försöksupställning | 13 |
| 2.3 Analys | 16 |
| 2.3.1 Mikroskopyanalys | 16 |
| 2.3.2 Toxicitetstest | 16 |
| 2.3.3 Synpunkter på odlingsteknik och toxinanalysmetod | 17 |
| 3. Resultat | 20 |
| 3.1 Artsammansättning i provvattnet | 20 |
| 3.2 Odlingsresultat | 20 |
| 3.3 Toxinhalter | 21 |
| 4. Diskussion | 23 |
| 5. Jämförelser med tidigare studier | 25 |
| 6. Rekommendationer | 26 |
| Tack | 28 |
| Referenser | 29 |

Bilaga 1: Odlingsbilder

Abstract

In recent years the number of reports of toxic cyanobacterial blooms in meso-eutrophic surface water bodies both in Sweden and globally has increased. Frequently occurring water blooms lead to an increased risk of human exposure through drinking water, recreational activities (e.g. bathing) and food. Microcystins (Mcyst) is the most commonly produced toxin family associated with cyanobacteria and epidemiological evidence has shown that chronic exposure to microcystins might be one contributing factor to enhanced frequency of liver cancer in some areas in China. It is therefore important to quantitatively and qualitatively study different uptake routes to humans.

In this study the uptake and translocation of microcystins in lettuce and radish was quantitatively analysed with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. One week old plants were exposed daily to environmentally relevant levels (0.74 and 8 µg Mcyst/l) of microcystins for 12 days. The uptake routes tested were either through the roots of plants grown in hydrocultures or through the whole plant surface for plants grown on a conventional soil medium. Whole roots and radishes and lettuce leaves were pooled (from 4 individuals), freeze dried and homogenised. Some samples were rinsed in distilled water before being pooled. The microcystins were extracted in an ammonium hydrogen carbonate buffer and filtrated (0.45 µm) before adequate dilution in a phosphate buffer solution (pH 7.5) and analysed with an ELISA-test kit.

In both lettuce and radish, grown in hydrocultures (8 µg Mcyst/l) uptake through the roots and transport to the upper parts of the plants were observed. In the radish an average of 0.18 µg Mcyst/g dry weight (d.w.) and in the radish roots 0.07 µg Mcyst/g d.w. was recorded. Values for lettuce was 0.01 µg Mcyst/g d.w. in the leaves and 0.15 µg Mcyst/g d.w. in the roots. In plants grown on soil, watered with water containing 8 µg Mcyst/l an average of 0.024 µg Mcyst/g d.w. was recorded in the radish (stem) and 0.074 µg Mcyst/g d.w. in lettuce leaves. The microcystin content was about 75% lower in rinsed lettuce leaves implying that much of the microcystin is not absorbed but remain on the leaf surface when watered from above. In plants exposed to 0.74 µg Mcyst/l no uptake through the root or plant surface was observed. No cross reactivity of the ELISA-test with compounds in the plant tissue was observed.

The results indicate that it is possible for humans to be exposed to microcystins through vegetables. It is unlikely that acute toxic effects will occur but the possibility of long term effects

cannot be excluded. The tolerable daily intake (TDI), 0.04 µg Mcyst/kg body weight (WHO provisional recommendation) might be exceeded in areas where microcystin contaminated water is used for irrigation, if the microcystin levels observed in this study are representative for levels in staple crops as cereals, potatoes, rice etc.

1. Inledning

1.1 Allmänt

Med tilltagande mänsklig användning av gödningsmedel, utsläpp av närsalter i avloppsvattnet och utsläpp av luftburna kväveföreningar ökar näringshalterna i ytvattnet, vilket leder till ett större antal organismer. En av de grupper som gynnas är cyanobakterier, som även kallas blågröna alger. Cyanobakterier utgör en viktig del i de akvatiska ekosystemen bland annat därför att många kan binda luftens kväve, något som senare kan komma andra organismer till godo. Normalt utgör inte cyanobakterier något problem, men vid ökad tillförsel av näringsämnen sker en massutveckling (vattenblomning), vilket leder till problem för både människor och djur. Dessutom blir det ofta störningar i hela det akvatiska ekosystemet med minskad biologisk mångfald som följd. De olägenheter som uppstår för människan är av flera slag. En aspekt är de rent estetiska effekterna. När vattnet har förvandlats till en grön, illaluktande sörja begränsas möjligheterna att utnyttja det för bad, hobbyfiske eller andra vattenaktiviteter (vattenskidåkning, dykning m.m.). Redan vid måttlig massutveckling av cyanobakterier kan både smak- och luktförsämringar påverka vattnets användbarhet som dricksvatten. Betydligt allvarigare är dock att många cyanobakterier producerar olika toxiner som orsakar bl.a. lever- och nervskador på både djur och människor. De har också rapporterats orsaka allergiska besvär och hudirritationer hos människor (Chorus *et al.*, 1999, Willén *et al.*, 1997). Flera cyanotoxiner, d.v.s. toxiner som produceras av cyanobakterier, är lika potenta som kobragift, se fig. 1, och från litteraturen finns talrika rapporter om dödsfall från skilda delar av världen bland såväl däggdjur, fåglar och fiskar i samband med massutveckling av cyanobakterier (Carmichael, 1994, Lambert *et al.*, 1994, Chorus *et al.*, 1999). Det finns även ett antal rapporter om dödsfall hos människor orsakade av cyanotoxiner (Chorus *et al.*, 1999). Flera undersökningar har påvisat cyanotoxiner (t.ex. microcystiner, Mcyst) i dricksvattnet trots behandling i konventionella reningsverk med fällning, sedimentering och klorering (Lambert *et al.*, 1994, Skulberg, 1991). De ekologiska effekterna av cyanotoxiner är dåligt kända. Många algtoxiner kan påverka både växt- och djurplankton, vilket eventuellt kan inverka på den akvatiska näringskedjan åtminstone på kort sikt (Carmichael, 1994, Chorus *et al.*, 1999). Andra organismer, som t.ex. musslor, verkar inte påverkas i någon större utsträckning trots att de ackumulerar stora mängder cyanotoxiner (Chorus *et al.*, 1999).

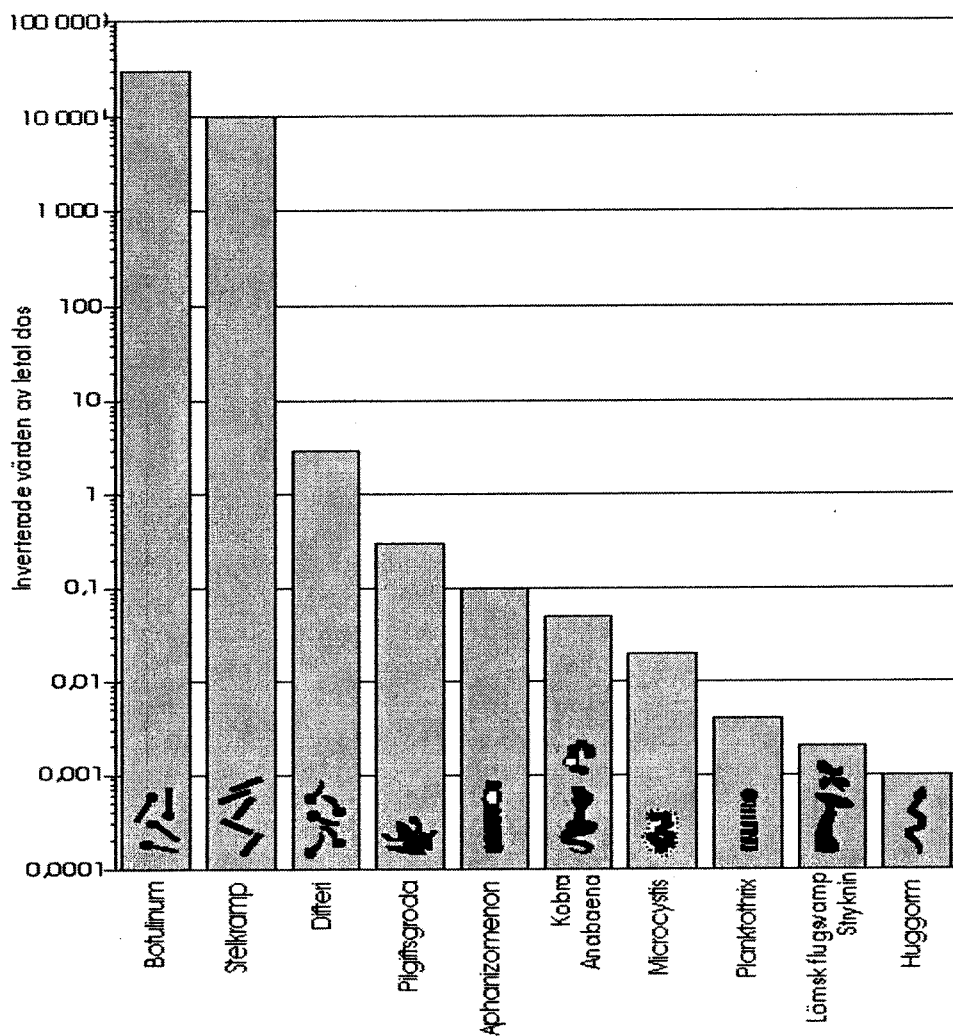


Fig. 1. Jämförelse av olika naturligt förekommande gifters toxicitet. Den relativa toxiciteten anges som inverterade värden, d.v.s. botulinum är giftigast.

1.2 Vilka gifter producerar cyanobakterier - och varför?

Av omkring 2000 beskrivna arter av cyanobakterier har ett 40-tal rapporterats vara toxinproducerande (Annadotter *et al.*, 1994). I figur 2 visas tre toxinproducerande arter av cyanobakterier. Cyanotoxinerna är s.k. sekundära metaboliter och bildas i komplicerade och energikrävande processer (Sundh, 1997). Det är därför inte troligt att de framställs av en slump och att de rent tillfälligtvis råkar vara giftiga. Det ger ingen evolutionär fördel. Snarare är det så att toxinerna spelar en viktig roll för cyanobakteriernas överlevnad på samma sätt som högre växter bildar sekundära metaboliter för kommunikation, kemisk krigföring, näringsupptag etc. Exakt vilken betydelse de har är dock inte klarlagt (Lambert *et al.*, 1994, Sundh, 1997, Willén *et al.*, 1995). Det har

dock visats att toxinerna skyddar mot betning genom att de har toxisk effekt på växtplanktonätande djurplankton t.ex. *Daphnia sp.* (Carmichael, 1994). Likaså är de toxiska mot andra växtplankton och genom att inhibera deras tillväxt kan cyanobakterierna få konkurrensfördelar.

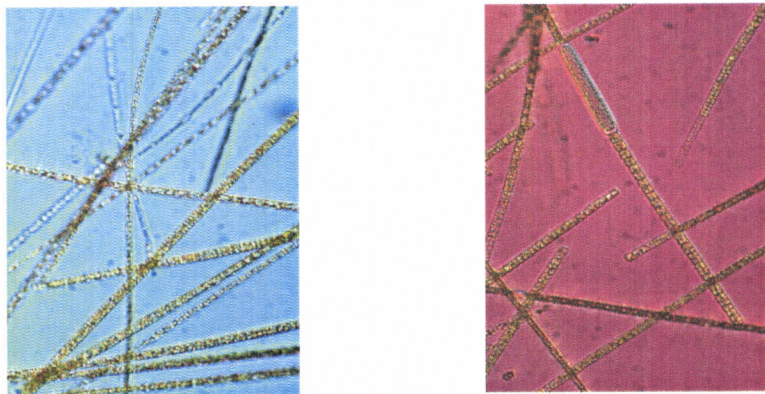


Fig. 2. Två toxinproducerande cyanobakterier från Lilla Ullfjärden, *Planktothrix prolifica* (t. vänster) och *Aphanizomenon flos-aquae* (t. höger). (Foto E. Willén.)

Cyanotoxinerna brukar delas in i hepatoxiner (levergifter), neurotoxiner (nervgifter) och lipopolysackarida endotoxiner (LPS). Dessa skiljer sig mycket åt vad gäller toxisk effekt, giftighetsgrad, vattenlöslighet och persistens (Carmichael, 1994, Lambert *et al.*, 1994). Globalt sett är hepatotoxinerna den grupp cyanotoxiner som oftast påträffas i samband med vattenblomningar (Chorus *et al.*, 1999). Hepatotoxinerna utgörs av två olika toxinfamiljer, microcystiner (Mecyst) och nodulariner, som båda kemiskt sett är cykliska peptider. I fig. 3 visas den generella strukturformeln för en av de varianter av microcystin som identifierats. Microcystinerna, som främst har isolerats från släktena *Anabaena*, *Microcystis* och *Planktothrix*, består av sju aminosyror (heptapeptider). Nodularinerna däremot består av fem aminosyror (pentapeptider) och har isolerats från bl.a. släktet *Nodularia* som massutvecklas i Östersjön. Hittills är över 60 microcystiner och ett 10-tal nodulariner kända (Sundh, 1997). Efter en vattenblomning kan microcystiner ofta spåras i vattnet under lång tid eftersom de är extremt stabila och inte oxideras eller hydrolyseras vid normala pH förhållanden. Även efter kokning är microcystiner potenta. Microcystiner fotolyseras endast långsamt men vid närvaro av pigment (humösa ämnen) och i starkt solljus går det snabbare och de kan då brytas ned till 90 % på två till sex veckor. I mörka naturliga vatten kan microcystiner bevaras i flera år (Chorus *et al.*, 1999).

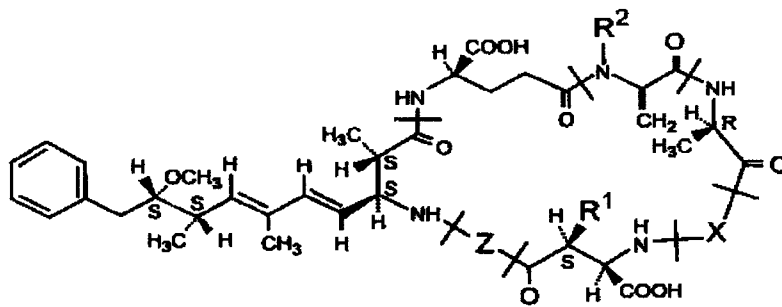


Fig. 3. Den generella strukturen för microcystin-LR (Från Chorus *et al.*, 1999).

1.3 Massutveckling av cyanobakterier - regleringsmekanismer

Det är främst fyra faktorer som gynnar massutveckling av cyanobakterier: svag eller ingen vind, en vattentemperatur mellan 15-30⁰C, neutralt eller svagt alkaliskt vatten (pH 6-9) och god tillgång på framför allt fosfat (Carmichael, 1994). Men även balansen mellan olika oorganiska kväveföreningar kan ha betydelse (Blomqvist *et al.*, 1994). Under dessa förhållanden har cyanobakterier en konkurrensfördel framför många andra alger. Det är mycket omdiskuterat exakt vad som styr massutveckling av cyanobakterier, deras inbördes artkonkurrens och vad som utlöser toxinproduktion. Några av de viktigaste faktorerna och sambanden beskrivs nedan.

En av de viktigaste faktorerna är tillgången på näringsämnen som reglerar den biologiska produktionen (Chorus *et al.*, 1999). Totalfosforhalten är den parameter som samvarierar bäst med algbiovolym (fig. 4). Långvariga massutvecklingar av cyanobakterier uppstår främst i vatten med fosforhalter över 50 µg/l, det vill säga i sjöar som klassats som eutrofa eller hypertrofa enligt svenska normer (Naturvårdsverket, 1999).

Ljusintensiteten är en annan viktig abiotisk faktor (Chorus *et al.*, 1999). Cyanobakterier behöver lite energi för livsuppehållande metaboliska funktioner och kan därför konkurrera ut andra alger i grumliga vatten. Anpassning till svagt ljus innebär att stora populationer cyanobakterier kan utvecklas även på större djup, t.ex. vid metalimnion (språngskiktet). För att nå optimala ljusförhållanden har många cyanobakterier möjlighet att snabbt förflytta sig vertikalt i vattenmassan med hjälp av gasfyllda blåsor, något som är särskilt utslagsgivande i konkurrensen med andra alger.

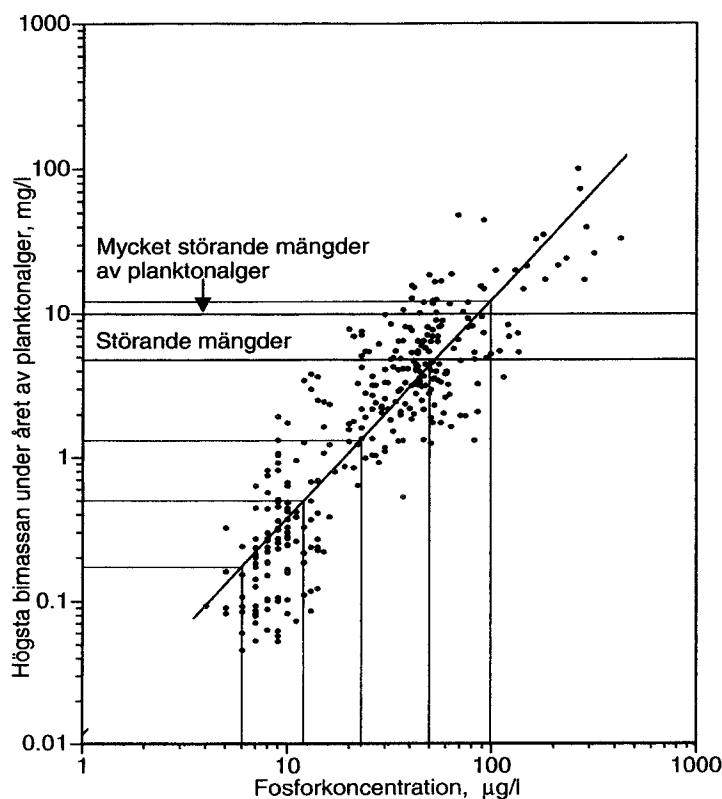


Fig. 4. Total algbiomass i förhållande till total fosforhalt.

Då cyanobakterier har en relativt låg tillväxthastighet dominerar de sällan i vatten med kort omsättningstid eller där stor turbulens råder (Chorus *et al.*, 1999). Där utvecklas i första hand kiselalger, vissa grönalger och stora flagellater.

En stor del av svårigheten med att förutsäga vattenblomningar beror på det faktum att olika dominerande grupper av alger avlöser varandra i ett komplicerat samspel under den årliga sommarsuccessionen med start- och ändpunkter i vår- respektive höstcirkulationen (Naturvårdsverket, 1999). I Sverige massutvecklas cyanobakterier vanligen under perioden juli – september.

1.4 Situationen i Sverige

Det finns idag ingen heltäckande inventering av antalet sjöar i Sverige med avseende på toxiska vattenblomningar, men av de vattenblomningar som rapporterats är knappt hälften (47 %) toxiska (Willén *et al.*, 1997). Motsvarande siffra för Europa är 53 % (Chorus *et al.*, 1999).

17 % av samtliga Sveriges sjöar är näringsrika (eutrofa, 25-50 µg P/l) eller mycket näringsrika (hypertrofa, >50 µg P/l) (Wilander *et al.*, 1995). Fördelningen av sjöar med massutveckling av toxinproducerande cyanobakterier följer i stort fördelningen av eutrofa och hypertrofa sjöar

(Naturvårdsverket, 1993, Willén *et al.*, 1997). Av fig. 5 framgår i vilka sjöar cyanotoxiner kunde påvisas under perioden 1981-95.

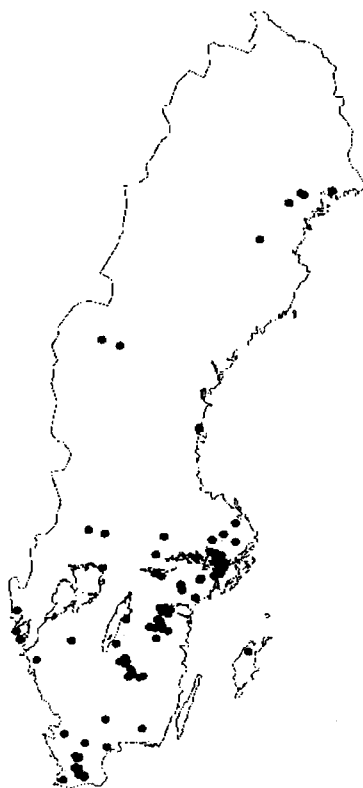


Fig. 5. Förekomst av vattenblommande sjöar med toxiska stammar av cyanobakterier 1981-97.

Sammanfattningsvis kan sägas att massutveckling av cyanobakterier främst kan förväntas i svenska slättbygder, där den höga befolkningstätheten leder till att risken för att människan ska exponeras för cyanotoxiner är relativt stor. Exponeringen kan ske främst via dricks- eller badvatten och animalisk föda (fisk, musslor). Exponering kan också ske genom att cyanotoxiner upptas eller fastnar på ytan av jordbruksprodukter när jordbrukare eller privatpersoner konstbevattnar sina odlingar med sjövattnet.

1.5 Microcystinernas effekter på djur och växter

1.5.1 Effekter på djur och människor

Microcystinerna inhiberar fosfataserna proteinfosfatas 1 och 2A, vilket gör att de påverkar ett stort antal processer i kroppen, t.ex. glykogenmetabolism, celledelning och uppbyggnad av cellskelettet (Lambert *et al.*, 1994). Naturlig exponeringen för microcystiner sker huvudsakligen via dricksvattnet,

där microcystinerna finns antingen löst i vattnet eller i eventuella förekommande hela cyanobakterieceller, eller via födan då t.ex. musslor och fisk kan ackumulera microcystiner. Upptag av microcystiner genom huden är ej studerat men förväntas inte vara högt, däremot kan allergiska reaktioner uppstå vid kontakt med cyanobakterier under exempelvis bad. Eftersom microcystiner inte är flyktiga, är exponering genom inhalation troligen försumbar utom möjligen om microcystiner är lösta i luftburna aerosoler – ett fenomen som är möjlig vid så kraftiga vattenblomningar att skumbildning uppstår. De akuta effekterna av microcystinförgiftning vid oralt intag uppträder främst i levern, som är det organ som uppvisar de högsta toxinhalterna. Orsaken till detta är att microcystinerna transporteras till levern via samma system som nyttjas av gallsalterna (Sundh, 1997). Microcystiner hämmar nybildning av mikrofilament som bygger upp cellskelettet, vilket gör att levercellerna förlorar sin struktur och lossnar från varandra. Om kapillärerna i levern påverkas, leder det till massiva inre blödningar med dödlig utgång.

Microcystiner har också påvisats ha en cancerogen effekt på försöksdjur. Ito *et al.* (1997) har visat att microcystin möjligen kan fungera som en initiator, d.v.s. vara en direkt carcinogen substans. Försök på råttor har visat att microcystin är en potent tumörpromotor redan vid 10 µg/kg kroppsvikt (intraperitoneal exponering 2 ggr per vecka). Denna dos är tre tiopotenser lägre än den dos som krävs för andra kända tumörpromotorer som fenobarbital, hexaklorocyklohexan och cyprotonacetat (Lambert *et al.*, 1994). Det gör microcystin till en av de mest potenta tumörpromotorerna man känner till. En hypotes till hur microcystinerna fungerar som tumörpromotorer är att inhibering av proteinfosfataser leder till att balansen mellan de substanser som styr tillväxt och celledelning går förlorad, d.v.s. en ohämmad celledelning sker. Kronisk exponering för låga doser microcystin har bidragit till ökad tumörpromotion i levern hos människa. I Kina har en epidemiologisk studie visat att levercancer var avsevärt vanligare hos personer som tog sitt dricksvatten från vattenblommande diken och dammar än hos dem som tog brunnsvatten (Chorus *et al.*, 1999).

1.5.2 Effekter på växter

Microcystiners effekter på växter är inte lika väl undersökta som deras effekter på djur. MacKintosh *et al.* (1990) har visat att en av microcystinerna, microcystin-LR (M cyst-LR), hämmar proteinfosfataser hos både djur och växter (t.ex. raps, morot, vetblad och ärtblad) på samma sätt och vid samma koncentrationsintervall. Att växter kan ta upp och påverkas av microcystiner har visats av

bl.a. Kurki-Helasma *et al.* (1998). Där påvisas att tillväxten minskar och proteinfosfatasaktiviteten halveras hos senapsfrön som odlas på ett fast medium med tillsats av microcystin (0.8 µg/ml) i sju dagar. Vid microcystinhalter över 5.0 µg/ml blev plantorna missformade. Då framför allt rotförlängning och rothårstillväxt hämmades knöts detta till microcystiners kända effekt att inhibera defosforylering av proteiner i cellerna. Detta hämmar i sin tur transport av auxin, det tillväxthormon som styr bl.a. rotförlängning och rothårstillväxt till tillväxtområdena. Liknande resultat har även erhållits av Kos *et al.* (1994) där en 50 % inhibering av tillväxten hos senapsfrön observerades vid en microcystinkoncentration av 3 µg/ml odlingsmedium. Skillnader i känslighet hos olika växtarter som majs och senap har också påvisats (Stoltz, 1998). En mer än 50 %-ig hämning av fotosyntesen har observerats hos böna vid engångsexponering av bladen för >10 µg Mcyst-LR/ml vattenlösning. Vid engångsexponering för 10 µg Mcyst/ml vatten var effekten övergående inom 5 dagar. Vid exponering för 100 µg Mcyst/ml vatten förblev fotosyntesen hämmad i 8 dagar. Upprepad exponering av bladen under 7 dagar med 0.02 µg Mcyst/ml visade en kraftig reduktion av fotosyntesen, vilket tyder på att även långvarig exponering för låga halter microcystin kan påverka växter negativt (Abe *et al.*, 1996).

Det finns endast ett fåtal rapporter i litteraturen som visar hur mycket microcystin som verkligen tas upp av växter exponerade för microcystin. Till synes friska groddplantor av senap, som odlats på fast agargel i 7 dagar med 0.25 µg Mcyst/ml gel, innehöll 5.3 µg/kg färskvikt (f.v.) efter sköljning (Kurki-Helasma *et al.*, 1998). I undersökningen användes radioaktivt märkt Mcyst. I en annan undersökning analyserades microcystininnehållet i sallad som odlats kommersiellt och bevattnats med sjövattnet med massutveckling av cyanobakterier, bl.a. *Microcystis aeruginosa* (Codd *et al.*, 1999). I de yttre distala bladen uppmättes 0.88 µg Mcyst/g torrsvikt (t.v.) och i den basala delen på de centrala bladen (i 'huvudet') 2.5 µg Mcyst/g t.v.. Makroskopiska gröna partiklar kunde observeras på bladytan 10 dagar efter sista bevattningen och algsaumet på sjön där vattnet togs innehöll 3.23 µg Mcyst-LR ekvivalenter/mg algsaum (t.v.). Hur länge bevattningen med microcystinbemat vatten hade pågått var inte känt. Analysen gjordes immunologiskt (CIPPIA immunoassay). Ingen av dessa undersökningar svarar dock fullständigt på frågan hur mycket microcystin som tas upp i grönsaker, som bevattnas med ett microcystinhaltigt vatten, där toxinhalten är av en sådan storleksordning som kan föreligga vid kraftig vattenblomning. Inte heller kan man utläsa om upptaget sker huvudsakligen via rötterna eller bladytan eller om transport inom växten förekommer. Det är frågor som belyses i detta arbete.

1.6 Målsättning

Syftet med detta arbete var att kvantitativt bestämma hur mycket microcystin som togs upp av isbergssallad (*Lactuca sativa*) och rädisa (*Raphanus sativus*) som odlats på jordmedium vid konventionell bevattning med sjövattnet innehållande cyanobakterier i massutveckling. I det använda vattnet var den massutvecklade arten *Planktothrix prolifica* (Grev.) Gom. dominerande. De uppmätta halterna jämfördes sedan med världshälsoorganisationens (WHO) rekommenderade gränsvärden och TDI (tolerabelt dagligt intag) för att belysa eventuella hälsorisker med att använda sjövattnet med massutvecklade cyanobakterier för bevattning inom kommersiell växthusodling och privat hobbyodling. Förutom att kvantitativt bestämma halten microcystin i sallad och rädisa, studerades även upptagsvägar och transport av microcystin från rot till stjälk och blad i växterna vid odling i hydrokultur genom att rötterna exponerades. Valet av sallad och rädisa som försöksväxter styrdes bland annat av att de är omtyckta och ofta konsumeras av en stor del av befolkningen, samt att båda är lätt- och snabbodlade i växthus, där kontrollerade förhållanden råder. Sallad har en stor bladyta och huvuddelen av den näring och det vatten som salladen tar upp genom rötterna investeras i bladmassan. Microcystinupptag i sallad har dessutom studerats tidigare, vilket möjliggör jämförelser (Codd *et al.*, 1999). Rädisa valdes för att kunna jämföra microcystinupptag mellan två olika växter. Rädisa lagrar huvuddelen av den upptagna näringen i stjälken (rädisan) och inte i bladen som hos sallad och därför kan eventuella skillnader i anrikningsplats belysas.

2. Material och metoder

2.1 Provtagning

Provvattnet med microcystin togs 99.07.16 från Lilla Ullfjärden, en avskild vik, som via Ekoln söder om Uppsala har förbindelse med övriga delar av Mälaren. Siktdjupet mättes med en siktskiva till ca 3 m. Med en termometer lokaliserades språngskiktet till 7.0 meters djup. På denna nivå utvecklas varje sommar en stor population av den starkt toxiska och kraftigt rödfärgade arten *Planktothrix prolifica*, en i Lilla Ullfjärden ekologiskt och toxikologiskt väl undersökt art (Willén *et al.*, 1984, Willén *et al.*, 1999). Provvattnet pumpades upp, dels från metalimnion (7 m, 11⁰C), ett vatten som var svagt rödfärgat, dels från epilimnion (3.5 m, 15⁰C). Det senare provvattnet var ofärgat. Provvattnet från metalimnion koncentrerades ca 430 ggr genom att ca 3500 l vatten filtrerades i planktonhåv

(maskstorlek 10 μm) till en slutvolym på 8 liter. Det provvatten som togs från ytan filtrerades eller koncentrerades ej. Vattnet frystes (-20°C) ca 3 tim. efter provtagningen. Allt provvatten frystes och tinades minst två gånger innan det användes för bevattnings för att lysa samtliga algceller så att microcystinet frigjordes. Provvattnet förvarades mörkt i kylrum (4°C) innan användning (totalt under ca 3 veckor).

Med Ruttnerhämtare togs även vattenprover för kvantitativ bestämning av organismsammansättning och planktonbiomassa i metalimnion och epilimnion. De senare proverna konserverades genast i jodjodkaliumlösning surgjord med ättiksyra enligt gängse rutiner vid provhantering av växtplankton. Dessa prover förvarades sedan mörkt i rumstemperatur innan analys.

2.2 Växtmaterial, odling och försöksuppställning

Isbergssallad (*Lactuca sativa*) och rädisa (*Raphanus sativus*) odlades på ett jordmedium samt i hydrokultur i klimatkammare vid 27°C dagtid och ca 17°C nattetid. Odlingarna belystes 18.5 tim. per dygn med artificiellt ljus (metall-halogenlampor, Philips Son-T-plus 400W, 6A, placerat ca 1.1 m över växterna) med en ljusintensitet av ca $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ vid bladytan vilket motsvarar knappt en tredjedel av normalt dagsljus (ca $1700 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Mätningen gjordes med en ljusmätare försedd med en sfärisk sensor (Biospherical Instruments Inc., San Diego, Kalifornien). Luftfuktigheten var 50-60 % dagtid och 80-90 % nattetid.

Frön av isbergssallad (*Lactuca sativa* v. Great Lakes, Svalöf Weibull Trädgård AB, Hammenhög) och rädisa (*Raphanus sativus* v. French Breakfast, Bröderna Nelsons Frö AB, Tingsryd) användes. Fröna blötlades ca 15 tim. innan de såddes i jordmediet (Hasselfors Garden E-jord för yrkesodlare: vermikulit, 60:40) eller lades på fuktat papper i slutna petrisskålar för groddning (ca 20°C , lysrörsbelysning). När groddplantorna var lagom sträckta efter fyra dygn tändes metall-halogenlamporna. Efter ytterligare 2 dygn 'flottades' de groddplantor, som skulle odlas i hydrokultur, i en 0.25 mM kalciumsulfatlösning på små proppar av skumplast så att rötterna var helt under vattenytan med hjärtbladen uppåt. En homogen grupp med avseende på rot- och skottlängd, mängd rothår, färg o.s.v. valdes ut. En del av groddplantornas rötter skadades när de drogs loss från det fuktade papperet de växt på, men det bedömdes inte ha någon betydelse för utgången av försöket. Efter ytterligare två dygn överfördes groddplantorna till plastbunkar (1 lit.) som var rengjorda med en svag klorinlösning. Homogena groddplantor valdes ut och fyra stycken placerades i en skumplastplatta

av polystyren som avpassats för att exakt passa till varje plastbunke (se appendix 1.). Den på så sätt fullständiga skuggningen av näringsmediet förhindrade oönskad alg tillväxt. Basen i näringsmediet var en 3 mM kalciumsulfatlösning. Baserat på genomsnittsvikten (10 groddplantor) för sallad respektive rädisa beräknades den mängd näringslösning som dagligen behövde tillsättas för att ge en 20 %-ig tillväxt (Bergmann, 1992, Petterson, 1986, modifierat enl. Marschner, 1995). Näringslösningen bestod av 25.00 mM K^+ , 3.75 mM Mg^{2+} , 8.23 mM Ca^{2+} , 69.25 mM N (56.40 mM NO_3^- , 12.85 mM NH_3^+), 4.00 mM PO_4^- , 1.00 mM Cl, 1.88 mM SO_4^{2-} samt mikronäringsämnen. Volymen näringsmedium hölls konstant vid en liter. Denna näringslösning och mängden som dagligen tillsattes är beräknad för att passa sallad. Det innebär att rädisorna troligen fick mer näring än de egentligen behöver. Visuellt verkar de dock inte ha påverkats negativt av detta. Odlingen skedde i odlingsplattor om 8 x 8 fack och frön, som hade såtts i jordmedium, vattnades inledningsvis med vanligt kranvatten och gallrades så att en groddplanta växte i varje fack. En vecka efter det att groddplantorna i hydrokultur getts näringslösning första gången (tot. 18 dagar efter groddning) började bevattningen av samtliga plantor med provvattnet innehållande microcystin. Sallads- och rädisplantorna i hydrokultur var då 2-3 cm långa och på jordmedium var de 5-6 cm respektive 4-5 cm.

Hydrokulturerna: Sallads- och rädisplantorna exponerades antingen för microcystin (8 μ g Mcyst/l) eller erhöll endast avjoniserat vatten (kontroll). 50 ml provvatten från metalimnion innehållande ca 80 μ g microcystin per liter tillsattes varje plastbunke. Efter 3 dagar tillsattes ytterligare 50 ml provvatten per plastbunke. Mcyst-koncentrationen i varje plastbunke uppgick då till ca 8 μ g/l vilket är en hög men inte otänkbar koncentration vid kraftig vattenblomning i Sverige. Då bladen ej kom i kontakt med provvattnet kan upptag av microcystin endast ske genom rötterna. Inga försök med ytvatten gjordes.

Odling på jordmedium: Sallads- och rädisplantorna bevattnades dagligen uppifrån med en liter vatten ur en kanna med en fin stril. Bevattningsvattnet bestod av utspätt provvatten från metalimnion (8 μ g Mcyst/l), ofiltrerat ytvatten (0.74 μ g Mcyst/l) eller, för kontrollen, endast avjoniserat vatten. För att förhindra övervattning fick odlingsplattorna stå ett par minuter direkt efter bevattningen och droppa av (uppskattningsvis ca 1-2 dl). Dag 6 och 7 gavs extra växtnäring (Byco Bact - biologiskt närings och jordförbättringsmedel) till samtliga plantor för att förhindra näringsbrist.

Samtliga plantor, både de i hydrokultur och de på jordmedium, exponerades under 12 dygn för samma koncentration och för lika stor mängd microcystin (8 resp. 0.74 μ g Mcyst/fyra plantor) vilket gör direkta jämförelser av upptaget microcystin möjligt.

Vid bevattningen användes samma utrustning (vollpipetter, mätkolv, vattenkanna o.s.v.) för samtliga plantor. För att förhindra kontaminering mellan proverna sköljdes all utrustning noggrant med avjoniserat vatten. Den fullständiga försöksuppställningen framgår av tabell 1 och av bildserien i bilaga 1 framgår hur odlingarna såg ut.

Tabell 1. Försöksuppställning för att påvisa upptag av microcystin (Mcyst) i 30 dagar gammal sallad (*Lactuca sativa* v. Great Lakes) och rädisa (*Raphanus sativus* v. French Breakfast). Plantorna odlades i klimatkammare antingen i hydrokultur (endast rotupptag) eller på konventionellt jordmedium med bevattning uppifrån (rot- och bladupptag med och utan Mcyst-rester på bladytan). Exponeringen för Mcyst skedde under de 12 sista dagarna före skörd. Hydrokulturerna odlades i näringslösning innehållande 8 µg Mcyst/l, d.v.s. ständig exponering. Jordkulturerna bevattades en gång dagligen med en bestämd mängd vatten innehållande antingen 8 µg Mcyst/l eller 0.74 µg Mcyst/l varvid även bladytan exponerades för microcystin. Samtliga plantor exponerades för samma mängd Mcyst under lika lång tid. Kontrollerna odlades under samma förutsättningar dock utan att exponeras för Mcyst.

| Upptagsväg Microcystin- exponering | Sallad | | Rädisa | |
|--|----------------------------------|---|------------------------------------|---|
| | Hydrokultur (rotupptag) | Jord (blad- och rotupptag, vatten uppifrån) | Hydrokultur (rotupptag) | Jord (blad- och rotupptag, vatten uppifrån) |
| 8 µg microcystin/l | Analys av blad- och rotvävnad | | Analys av rädise- och rotvävnad | |
| 0 µg microcystin/l (kontroll) | Analys av blad- och rotvävnad | | Analys av rädise- och rotvävnad | |
| 8 µg microcystin/l | | Analys av bladvävnad | | Analys av rädisvävnad |
| 8 µg microcystin/l | | Analys av sköljd bladvävnad | | |
| 0.74 µg microcystin/l | | Analys av bladvävnad | | Analys av rädisvävnad |
| 0 µg microcystin/l (kontroll) | | Analys av bladvävnad | | Analys av rädisvävnad |

De hjärtblad på rädisorna som började gulna under försökets gång räknades.

Efter 12 dagars exponering för microcystin skördades samtliga plantor, d.v.s. 30 dagar sedan sådd respektive groddning. Vid skörden valdes slumpmässigt fyra plantor ut att utgöra en växtenhet, d.v.s. de betraktas statistiskt som en enda planta. Detta är ett brukligt förfaringssätt när man odlar växter på det sätt som gjorts här, eftersom plantorna varierar mycket i storlek och i viss mån hälsa (Lundegårdh, muntligt). Växtenheterna sammanfördes två och två (totalt 8 st småplantor per prov) och färskvikten bestämdes. Salladsplantorna delades upp i blad (även vissnade) och rötter med snittet direkt under det nedre bladfästet. Rädisorna delades upp i själva rädisan med snitt strax under det nedre bladfästet och

vid den punkt där den breda rädiskstjälken övergår i en smal rot (vid de första smårötterna) och i rötter (allt under rädisan). De blöta rötterna torkades snabbt mellan pappershandukar. Vid sköljningen av salladsbladen lades plantorna i avjoniserat vatten i 0.5-1 min under lätt omrörning. Sedan fick de droppa av några minuter och torkades sedan snabbt mellan pappershandukar. De övriga salladsbladen och rädisorna torkades eller sköljdes inte av på något sätt. Därefter bestämdes färskvikten för samtliga prover. Medelvikten på salladsblad, rötter och rädisor beräknades och ett tvåsidigt T-test (N=5, p sattes till 0.05) gjordes för att se om det fanns någon statistiskt påvisbar skillnad mellan de plantor som exponerats för microcystin och den negativa kontrollen. Samtliga prover lades i vida 250 ml plastburkar med tättslutande lock innan de frystes in vid -20°C .

2.3 Analys

2.3.1 Mikroskopanalys

Bestämningen av frekvensen av förekommande cyanobakterier i provvattnet från Lilla Ullfjärden gjordes i ett omvänt mikroskop i 10 och 40 gångers objektivförstoring. Innan analys sedimenterades planktonorganismerna ned på botten av räknekammare som rutinmässigt används i mikroskoparbete med växtplankton (Utermöhl, 1958). Artsammansättningen bestämdes samt ingående arters andel av den totala cyanobakterievolymen, beräknad som mm^3/l . Volymen av enskilda arter beräknades efter anpassning till lämpliga stereometriska figurer. I regel räknades minst 100 individer av varje art. Microcystinkoncentrationen i provvattnet från metalimnion respektive epilimnion bestämdes med ett ELISA-test (se nedan).

2.3.2 Toxicitetstest

Microcystinhalterna analyserades med ett ELISA test 'kit' (Enzyme linked immunosorbent assay). Det test som användes var ett kompetitivt ELISA med enzymmarkerat microcystin av märket EnviroLogix Inc., Maine, USA. De antikroppar som används reagerar med den så kallade ADDA-molekylen som finns hos de flesta vanliga microcystiner (Chu *et al.*, 1990). Med ELISA-test kan man därför inte skilja på olika microcystiner utan resultatet blir ett värde på totalhalten. Frystorkat växtmaterial löstes i ammoniumvätekarbonat och späddes med en natriumklorid-fosfatbuffert (PBS) enligt Chu *et al.* (1990) med följande avvikelser:

- Samtliga prover löstes i ammoniumvätekarbonat till 5-10 ggr torrvikten (d.v.s. 5-10 ml $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{g}$ prov t.v.).
- Efter homogenisering och centrifugering (16 000 g i 30 min) sammanfördes supernatanten från proverna (två och två, d.v.s. fyra växtenheter/prov) innan den filtrerades (0.45 μm) för att undvika störningar orsakat av partikulärt organiskt material, s.k. matrixeffekter.
- Den kraftigt färgade supernatanten (röd från rädisa, grön från salladsblad och brungul från rötter) späddes 5-40 ggr med PBS (vanligen 5-10 ggr) innan den användes för analys.

Även sjövattnets innehåll av microcystin analyserades med ELISA. Provvattnet från metalimnion och epilimnion frystes och tinades minst 2 ggr för att sönderdela cyanobakteriernas celler så att toxinet kom ut i vattenfasen. Innan analys, enligt instruktion för det använda testet, förvarades proverna mörkt och kallt (+4°C) under 7 dagar. För att undvika matrixeffekter där t.ex. antikropparna i ELISA-testet blockeras av cellrester eller annat stort organiskt material centrifugerades proverna vid 30 000 g i 30 min. Vid analysen späddes proverna 10-100 ggr med avjoniserat vatten.

Den optiska densiteten mättes med en fotospektrometer modifierad för ELISA testplattor på Statens Livsmedelsverk, Uppsala.

2.3.3 Synpunkter på odlingsteknik och toxinanalysmetod

Odlingsteknik: Odlingsförhållandena i hydrokulturerna var troligen inte optimala eftersom både sallads- och rädisplantorna i hydrokultur var något blekare och tydligt mindre än de på jordmedium under hela försökets gång. Stjälken på rädisorna i hydrokultur började också svälla senare (ca 3 dagar) än de som odlades på jord. Troligen var belysningen för intensiv för rädisorna eftersom hjärtbladen på plantorna i hydrokultur och i viss mån även de på jordmedium började bli gula och/eller svagt rödaktiga efter ca 12 dagar. Växternas fysiologiska status kan ha påverkat upptaget av microcystin genom förändrat närings- och vattenupptag i rötterna, onormal utveckling och distribution av stomata samt tiden dessa hålls öppna, liksom onormal upplagring av näringsämnen m.m. Rädisorna, som odlats i hydrokultur, hade antagligen fått för mycket näring vilket kan ha lett till ett lägre näringsupptag och därmed mindre toxinupptag. Detta är dock inte säkert eftersom det inte är känt om microcystin tas upp aktivt eller passivt. Ett eventuellt lägre upptag av microcystin på grund av lågt

näringsupptag kan dock ha kompenserats genom en ökad transpiration och därmed ett ökat vattenbehov orsakat av den kraftiga belysningen.

Vid odlingen observerades skillnader i fråga om både storlek och vitalitet (visuellt med avseende på färg, bladstorlek och spänst) hos plantorna. Detta innebär att växtmaterialet kan ha varit för litet för att vara representativt. Kostnaderna för ELISA testet var en begränsande faktor för hur många analyser som kunde göras. Varje prov bestod av fyra sammanförda växtenheter, vilket i viss mån kompenserar för den individuella variationen eftersom värdet blir ett genomsnittsvärde. Trots detta är variationen mellan dubbelproverna som mest 280%.

Den exakta exponeringen av växterna för microcystin är inte känd eftersom provvattnet inte analyserades kontinuerligt under försökets gång. Endast en analys gjordes i slutet av odlingsperioden och en del microcystin kan ha börjat brytas ned på biologisk väg. Det anses dock vara stabilt (Chorus *et al.*, 1999). Eftersom provvattnet från metalimnion var koncentrerat 430 ggr så är den uppmätta microcystinkoncentrationen, 80 µg Mcyst/l, att betrakta som låg. Några prover analyserades upprepade gånger och ofta var koncentrationen microcystin något lägre vid det senare tillfället (ej redovisade resultat), vilket tyder på att microcystinet inte var helt stabilt. Detta innebär att koncentrationen av microcystin i provvattnet sannolikt var högre i början av odlingsperioden.

En direkt jämförelse av hur stort microcystinupptag, som kan förväntas i utomhusodlingar eller kommersiella växthus, försvåras av att växterna där utsätts för olika stressfaktorer, annorlunda behandling och ojämn eller endast kortvarig exponering för microcystin i varierande koncentrationer. **Toxinanalysmetod:** Extraktion av microcystin för analys med ELISA har tidigare endast beskrivits för frystorkat algmaterial och råvatten och inte för hela växter, vilket ledde till vissa praktiska svårigheter. Det frystorkade växtmaterialet måste spädas minst 5-10 ggr i ammoniumvätekarbonat för att någon vattenfas överhuvudtaget ska kunna avskiljas vid centrifugering. I början centrifugerades proverna 30 min vid antingen 16 000 g eller 30 000 g, vilket dock inte avlägsnade allt cellmaterial. Vid analyserna med ELISA uppstod matrixeffekter, som visade sig genom att samma koncentration microcystin uppmättes i prover som var spädda 5 respektive 10 gånger. Vid centrifugering vid 16 000 g följt av filtrering med 0.45 µm filter avlägsnades det mesta av cellmaterialet för att rimliga värden skulle erhållas.

För att inte späda proverna mer än nödvändigt och riskera att hamna under detektionsgränsen, där det inte är möjligt att fastställa någon microcystinkoncentration, prövades spädning av

ammoniumkarbonatlösningen 1:1, 1:5 och 1:10 med PBS samt enbart med destillerat vatten. Spädning till 20 ggr finns beskrivet i litteraturen (Chu *et al.*, 1990). Resultaten blev inte helt entydiga, men det beslöts att späda samtliga prover minst 5 ggr med PBS. Troligen krävs denna volym för att nå rätt pH.

Vid själva analysarbetet med ELISA metoden uppstod också ett antal svårigheter. Det svåraste momentet var att späda provet lagom mycket så att microcystinkoncentrationen hamnade inom standardkurvans intervall. Ett antal analyser fick göras innan det gick att se på de optiska täthetsvärdena (OD) hur långt ovanför eller under standardkurvan provet låg och därmed hur mycket provet skulle spädas. Noggrannhet vid pipettering är viktig vid alla steg men särskilt vid tillsättning av substratet och själva provet. Är pipetteringen ojämn blir standardkurvan dålig och hela testet måste göras om, förutom att analysresultatet för de enskilda proverna blir otillförlitligt. I detta arbete pipetterades med 'omvänd' pipetteringsteknik med pipetter och spetsar från Brand. Skakbord användes vid inkuberingen. Däremot verkar inte tiderna behöva hållas exakt, vilket underlättar vid analys av många prover samtidigt.

Valet av analysmetod (ELISA) är naturligtvis en mycket viktig faktor för de resultat som erhålls, vilket bör hållas i åtanke vid jämförelser med resultat som erhållits med andra analysmetoder. Positivt med ELISA är att det är lättanvänt, jämförbara kvantitativa data erhålls och reproducerbarheten är god (Rivasseau *et al.*, 1999). Bakgrunden ansågs vara negligerbar och resultaten har därför inte kompenserats för den. Då inget microcystin kunde påvisas i kontrollerna, förutom i ett kontaminerat prov, verkar ingen reaktion med andra ämnen i växtmaterialet ha förekommit.

Behandlingen av proverna kan också ha påverkat resultatet. Förluster i samband med extraktion, filtrering och möjligen nedbrytning av microcystin kan tänkas. Med den extraktionsmetod som har använts är utbytet 83 % (Chu *et al.*, 1990), vilket innebär att den verkliga halten microcystin i växtmaterialet är ca 20 % högre än den uppmätta (ingen korrektion har gjorts för detta).

Resultaten kan också ha påverkats av den mänskliga faktorn. Många olika fel kan ha gjorts vid olika steg under försöken. En del misstag upptäcktes under arbetets gång som t.ex. att provvattnet luktade illa (organisk nedbrytning), beräkningsfel och felvägningar.

3. Resultat

3.1 Artsammansättningen i provvattnet

Resultatet av den mikroskopiska undersökningen av artsammansättningen i provvattnet från metalimnion och ytvattnet framgår av tabell 2. I båda vattenproverna dominerade olika cyanobakterier. Endast enstaka djurplankton och algarter från andra taxonomiska grupper påträffades och de kan i sammanhanget försummas. I vattenprovet från metalimnion dominerade *Planktothrix prolifica* en art som ger provet dess svagt röda färg. Smala *Limnothrix spp.* och andra smala trådformade cyanobakterier utgjorde en mindre del av algvolymen. *Anabaena lemmermannii* och *Aphanizomenon flos-aquae* fanns också representerade. I ytvattnet dominerade de smala cyanobakterierna följt av *P. prolifica*, smala *Limnothrix spp.*, *A. flos-aquae* och *A. lemmermannii*. Den höga totala cyanobakterievolumen i metalimnion visar att Lilla Ullfjärden är kraftigt eutrofierad enligt de bedömningsgrunder för sjöar och vattendrag som utarbetats av Naturvårdsverket (1999). Gränsvärdet för mycket stor biomassa av cyanobakterier i juli-augusti går då vid 5 mm³/l.

3.2 Odlingsresultat

De hjärtblad på rädisorna som började gulna under försökets gång räknades. De rädisor, som odlats i hydrokultur och exponerats för microcystin, hade högst antal gulnade blad, vilket kan tyda på en toxisk effekt av microcystin redan vid 8 µg Mcyst/l. Ett liknande samband observerades även för de rädisor som odlades i jord även om det inte var lika tydligt. De plantor, som fick outspätt ytvatten (0.74 µg Mcyst/l), hade dock lägst antal gulnande hjärtblad.

Tabell 2. Artsammansättning av cyanobakterier från metalimnion (koncentrerat med 10 µm planktonhåv) och från epilimnion i Lilla Ullfjärden (99.07.16). Fördelningen anges i procent av total algvolym. Total algvolym avser algvolymen i det ofiltrerade och icke-koncentrerade sjövattnet.

| Art | Epilimnion (vol. %) | Metalimnion (vol. %) |
|---|---------------------|----------------------|
| <i>Planktothrix prolifica</i> | 20.3 | 90.0 |
| <i>Limnothrix spp.</i> | 14.7 | 3.9 |
| Övriga trådformiga cyanobakterier | 52.3 | 4.9 |
| <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> | 11.3 | <0.1 |
| <i>Anabaena lemmermannii</i> | 1.1 | 1.1 |
| Total cyanobakterievolum (mm ³ /l) | 1.8 | 17.0 |

Direkt efter skörd bestämdes färskvikten och medelvikten beräknades för samtliga prover. Ingen statistisk signifikant skillnad på biomassan vid exponering för microcystin kunde påvisas för något prov.

3.3 Toxinhalter

Analyserna av halten microcystin i provvattnet visade att provvattnet från metalimnion innehöll ca 80 µg Mcyst/l och ytvattnet 0.74 µg Mcyst/l (se tabell 3).

Tabell 3. Microcystinkoncentration (µg Mcyst/l) och standardavvikelse (SD) i provvatten från Lilla Ullfjärden (99.07.16) analyserat med ELISA-test. Samtliga prover frystes och tinades >2 ggr innan analys. Metalimnion-proverna har även koncentrerats (~ 430 ggr), filterats (10 µm) och centrifugerats (30 000 g, 30 min).

Epilimnion-provet togs på 3.5 m djup och analyserades direkt efter frysbehandling.

| <i>Prov</i> | <i>Mcyst ± SD (µg /l prov)</i> | <i>Spädning</i> | <i>Beräknad koncentration i provet (µg Mcyst /l)</i> |
|---------------|------------------------------------|-----------------|--|
| Metalimnion 1 | 0.715±0.031 | 100 | 71.6 |
| Metalimnion 2 | 0.921±0.004 | 100 | 92.1 |
| Epilimnion | 0.074±0.008 | 10 | 0.7 |

¹⁾ Dubbelprov.

Halterna microcystin i sallads- och rädisvävnaderna redovisas i tabell 4. Där framgår också hur mycket det frystorkade provet späddes (spädningsfaktor) i ammoniumvätekarbonat och PBS och omvandlingsfaktorn för hur många gånger lägre microcystinhalten per g färskvikt är i växtvävnaden jämfört med per g torrsvikt.

De högsta microcystinhalterna per g torrsvikt uppmättes i rädisa (0.24 µg Mcyst/g t.v.) och salladsrot (0.15 µg Mcyst/g t.v.) som odlats i hydrokultur med 8 µg Mcyst/l näringslösning. Rädisroten innehöll ungefär hälften så mycket (0.07 µg Mcyst/g tv) som salladsroten medan salladsbladen endast innehöll 0.01 µg Mcyst/g tv. Sallad som odlats på jordmedium och exponerats för 8 µg Mcyst/l innehöll de högsta microcystinhalterna (0.09 µg/g t.v.). De salladsblad, som hade sköljts noggrant efter skörd, innehöll ca en fjärdedel så mycket microcystin (0.02 µg/g t.v.). Ett <-tecken framför de uppmätta microcystinhalterna innebär att den egentliga halten ligger under detektionsnivån för testet (0.14 µg Mcyst/l). Den angivna halten anges för att visa vilken maximal microcystinhalt som kan tänkas förekomma i provet beroende på hur provet har späts.

Tabell 4. Uppmätt microcystinkoncentration (Mcyst) i extrakt från olika delar av sallad och rädisa efter 12 dagars exponering för microcystin analyserat med ELISA-test. Spädningen av det frystorkade växtmaterialet i ammoniumvätekarbonat och PBS anges som total spädningsfaktor (ml/g t.v.). Den beräknade microcystinhalten i växtproverna per g torr- och färskvikt samt den inverterade omvandlingsfaktorn från t.v. till f.v. beräknat som 1/(g t.v./g f.v.) anges. Fyra växtenheter har sammanförts i varje prov. Vid odling i hydrokultur har rötterna kontinuerlig exponerats för microcystin. Vid odling på jordmedium bevattnades växterna dagligen uppifrån varvid hela växten exponeras. **a** innebär exponering för 8 µg Mcyst/l, **b** innebär exponering för 0.74 µg Mcyst/l, **k** är kontrollen (utan microcystin). ¹⁾ Dubbelprov. ²⁾ Provet används ej eftersom värdet låg över mätintervallet. ³⁾ Provet har troligen blivit kontaminerat.

| Prov | Microcystin ± SD ¹⁾ (µg/l) | Spädnings- faktor | Microcystin (µg/g t.v.) | Inverterad omvandl. faktor från t.v. till f.v. | Microcystin (µg/g f.v.) |
|-----------------------------------|--|----------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| Hydrokultur | | | | | |
| Sallad, rot, k. 1 | <0.1426 | 50 | <0.00713 | 18.4 | <0.00039 |
| 2 | <0.1426 | 50 | <0.00713 | 18.3 | <0.00039 |
| Sallad, rot, a. 1 ²⁾ | >1.7952 | 50 | >0.058976 | 18.6 | >0.00317 |
| 2 | 0.7576±0.018 | 200 | 0.15152 | 19.6 | 0.00771 |
| Sallad, blad, k.1 | | | | | |
| 1 | <0.1425 | 25 | <0.00357 | 7.7 | <0.00046 |
| 2 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 7.6 | <0.00047 |
| Sallad, blad, a.1 | 0.4196±0.028 | 25 | 0.01049 | 8.1 | 0.00130 |
| 2 | 0.2955±0.005 | 25 | 0.00739 | 8.4 | 0.00088 |
| Rädisa, rot, k. 1 | | | | | |
| 1 | <0.1426 | 50 | <0.00713 | 15.6 | <0.00046 |
| 2 ³⁾ | 0.3569±0.025 | 50 | 0.01785 | 14.3 | 0.00125 |
| Rädisa, rot, a. 1 | 1.0524±0.057 | 75 | 0.07893 | 15.2 | 0.00519 |
| 2 | 1.1887±0.055 | 50 | 0.05944 | 14.8 | 0.00402 |
| Rädisa, k. 1 | <0.1426 | 36.7 | <0.00524 | 9.0 | <0.00058 |
| 2 | <0.1426 | 50 | 0.00713 | 9.8 | <0.00073 |
| Rädisa, a. 1 | 0.7081±0.012 | 164.1 | 0.11618 | 9.3 | 0.01249 |
| 2 | 1.7117±0.037 | 138 | 0.23631 | 9.67 | 0.02444 |
| Jordmedium | | | | | |
| Sallad, blad, k.1 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 8.6 | <0.00042 |
| 2 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 9.0 | <0.00040 |
| Sallad, blad, a.1 | 0.4554±0.064 | 132.9 | 0.06053 | 10.2 | 0.00594 |
| 2 | 0.7670±0.007 | 112.8 | 0.08650 | 10.3 | 0.00834 |
| Sallad, blad, a + sköljning. 1 | 0.8467±0.018 | 25 | 0.02117 | 9.5 | 0.00223 |
| 2 | 0.5564±0.015 | 25 | 0.01391 | 10.5 | 0.00133 |
| Sallad, blad, b. 1 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 9.7 | <0.00037 |
| 2 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 10.7 | <0.00033 |
| Rädisa, k. 1 | | | | | |
| 1 | <0.1426 | 35 | <0.00499 | 13.6 | <0.00037 |
| 2 | <0.1426 | 35 | <0.00499 | 14.6 | <0.00034 |
| Rädisa, a. 1 | 0.1834±0.019 | 55.4 | 0.01015 | 14.7 | 0.00069 |
| 2 | 1.3263±0.070 | 29.0 | 0.03846 | 13.6 | 0.00283 |
| Rädisa, b. 1 | <0.1426 | 25 | <0.00357 | 13.2 | <0.00027 |
| 2 | <0.1426 | 21.7 | <0.00309 | 12.8 | <0.00024 |

I de plantor på jordmedium, som exponerats för 0.74 µg Mcyst/l, kunde inte något upptag av microcystin påvisas. Bland de plantor, som odlats i hydrokultur och exponerats för 8 µg Mcyst/l innehöll rädisa i hydrokultur och salladsbladen på jordmedium de högsta microcystinhalterna per g färskvikt (0.024 respektive 0.008 µg Mcyst/g f.v.).

4. Diskussion

Den här undersökningen visar att kärlväxter som sallad och rädisa, kan ta upp cyanotoxinet microcystin vid bevattning från vattenblommande vattentäkt. Undersökningen av algsammansättningen i provvattnet från Lilla Ullfjärden visade att *Planktothrix prolifica* dominerade till 90 % i metalimnion. Släktet *Planktothrix* är känd som producent av det potenta levergiftet microcystin (Chorus *et al.*, 1999). I denna undersökning har främst upptaget av den microcystinvariant som produceras av *P. prolifica* undersökts och det är möjligt att upptaget i växter av olika microcystiner skiljer sig kvantitativt åt beroende på de olika toxinvarianternas kemikaliska och fysikaliska egenskaper (storlek, polaritet m.m.) och på olika enskilda växters upptagsmekanism.

Tidigare har ELISA-testet endast använts för analyser av vatten och djurmateriel men den här undersökningen visar att analyser av växtmaterial med vattenbaserade extraktionsmedel är praktiskt genomförbara.

Av studien framgår inte bara att microcystin tas upp i högre växter utan att det till viss del även kan transporteras i växten. I tabell 5 har de uppmätta microcystinhalterna i sallad och rädisa sammanställts. I rädisa, som odlats i hydrokultur där endast rötterna har exponerats för microcystin, har själva rädisan ca 2.5 ggr mer microcystin än rötterna. Detta visar att en relativt stor transport kan ske. I sallad, som odlats i hydrokultur, är halten microcystin i bladen betydligt lägre än i rötterna, men transport av microcystin kan ändå påvisas. Vad skillnaden mellan transporten i rädisa och sallad beror på är inte känt. Transporten till olika delar i växterna som frön, baljor, rotknölar, blad och stjälkar skiljer sig troligen åt, vilket kan ha stor betydelse för ackumuleringen av microcystin till ätliga delar i jordbruksgrödor.

Vid odling på jordmedium med bevattning uppifrån av hela bladytan uppmättes de högsta microcystinupptaget i salladsblad. Vid ordentlig sköljning av salladen minskade microcystinhalten med nästan 75 %, vilket visar att huvuddelen av microcystinet hade fastnat på bladytan.

Tabell 5. Översiktstabell. Genomsnittsvärden av uppmätta microcystinhalter (Mcyst) i de plantor som odlats i hydrokultur, 8 µg Mcyst/l näringslösning, och för de plantor som odlats på jordmedium och bevattnats med 8 µg Mcyst/l bevattningsvatten. Värdena är genomsnittsvärden av dubbelprover som i sin tur består av sammanlagt 16 plantor som har slagits samman innan analys.

| Prov | µg Mcyst/g t.v. | µg Mcyst/g f.v. | µg Mcyst/kg f.v. |
|-----------------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| Hydrokultur | | | |
| salladsrot | 0.151 ¹⁾ | 0.0077 ¹⁾ | 7.7 ¹⁾ |
| salladsblad | 0.009 | 0.0011 | 1.1 |
| rädisrot | 0.069 | 0.0046 | 4.6 |
| rädisa | 0.176 | 0.0185 | 18.5 |
| Jordmedium | | | |
| salladsblad | 0.074 | 0.0071 | 7.1 |
| salladsblad (sköljda) | 0.018 | 0.0018 | 1.8 |
| rädisa | 0.024 | 0.0018 | 1.8 |

¹⁾ Ett mätvärde.

Troligen har det största upptaget skett i stomata, eftersom microcystin är en förhållandevis stor och mycket vattenlöslig molekyl vilket betyder att upptaget via rötterna i ett jordmedium är litet eller försumbart.

Det innebär att sköljning vid skörd är ett enkelt sätt att sänka halten microcystin i produkten. En annan möjlighet är att bevattna på ett sådant sätt att växtens blad och stjälk ej kommer i kontakt med vattnet.

Det finns idag inga internationellt erkända fastställda gränsvärden för microcystin i dricksvatten eller föda. Världshälsoorganisationen (WHO) har dock fastställt ett provisoriskt tolerabelt dagligt intag (TDI) för microcystin på 0.04 µg/kg kroppsvikt för människa, varvid hänsyn har tagits till microcystiners potential som cancerpromotorer (Chorus *et al.*, 1999). Utifrån detta har WHO fastställt ett provisoriskt riktvärde på 1.0 µg Mcyst/l dricksvatten för människa vid dagligt intag. De påpekar dock att kortvariga moderata överskridanden kan accepteras. Delstaten Oregon, USA, har fastställt ett gränsvärde för kosttillskott innehållande cyanobakterier på 1 µg Mcyst/g produkt för en normal person (60 kg). Det tillåter en daglig konsumtion av 2.4 g av en produkt som innehåller 1 µg Mcyst/g utan att TDI överskrids. Resultaten från odling av sallad och rädisa på jordmedium, som är ett relativt verklighetsnära odlingsätt, visar att halten microcystin uppgår till ca 0.007 µg Mcyst/g f.v. för icke sköljd sallad respektive ca 0.002 µg Mcyst/g f.v. för rädisa och sköljd sallad (tabell 5). Det innebär att en vuxen person måste konsumera nästan 300 g icke sköljd sallad för att överskrida WHO:s fastställda värde. Det är fem gånger så mycket som en normal salladsportion på 60 g (Beckers, muntligt). Normalt konsumerar varje svensk ca 30 g blandad sallad per dag (inkl. tomat, gurka m.m.) men då

detta är ett genomsnittsvärde finns det många som äter betydligt mer. Det intressanta i det här sammanhanget är dock att microcystinupptag i jordbruksväxter har kunnat påvisas redan vid en relativt låg (8 µg Mcyst/l) och kortvarig exponering för microcystin. Som jämförelse förekommer rapporter om microcystinhalter på mellan 0.02 - 1800 µg löst Mcyst/l vid kollaps av stora vattenblomningar i naturliga vatten (Chorus *et al.*, 1999). Från Sverige har rapporterats om microcystinhalter på upp till 13 µg löst Mcyst/l i sjövattnet (Hult *et al.*, 1997, Willén *et al.*, 1999). Det innebär att om microcystinupptaget i växter är direkt proportionellt mot koncentrationen i bevattningsvattnet så kan upptaget vid långvariga kraftigt toxiska vattenblomningar bli betydligt större än vad som redovisas här. Vid tilltagande eutrofiering av svenska insjöar kommer frekvensen av toxiska vattenblomningar att öka, och en större andel av de odlade basvarorna (potatis, sädesslagen, olika grönsaker m.m.) riskerar att bevattnas med vatten innehållande microcystiner. Eftersom dessa konsumeras i stora mängder jämfört med t.ex. sallad, behöver microcystinhalterna inte vara mycket större än de som påvisats i den här studien för att konsumenterna åtminstone periodvis ska överskrida TDI-värdet. Barn är extra utsatta, eftersom de har lägre kroppsvikt och en relativt hög ämnesomsättning. En ökad frekvens av vattenblomningar riskerar också att leda till en ökad exponering för microcystiner via dricksvattnet, via bad i insjövattnet och via animalisk föda (t.ex. musslor) så att TDI överskrids. De uppmätta halterna av microcystin kan också jämföras med de svenska gränsvärdena för livsmedel som gäller för andra carcinogena ämnen. Många mögelsvampgifter är carcinogena och för t.ex. okratoxin är gränsvärdet 5 µg/kg f.v. och för aflatoxin (en av de mest potenta carcinogenerna man känner till) 4 µg/kg f.v.. I mjölk har dock värdet satts till 0.05 µg/kg eftersom barn är känsligare. De uppmätta microcystinhalterna ligger dock lägre än de svenska gränsvärdena som har satts för många pesticider som sträcker sig över intervallet µg till mg/kg livsmedel beroende på substansens egenskaper, bl.a. carcinogenitet.

5. Jämförelser med tidigare studier

De uppmätta halterna microcystin i sallad och rädisa i både hydrokultur och på jordmedium (se tab. 5) är i samma storleksordning som de som observerats av Kurki-Helasma *et al.* (1998) i groddplantor av senap. Dessa hade dock exponerats för microcystin under andra betingelser: lägre koncentration, kortare tid och under ett tidigare tillväxtstadium. Detta tyder på skillnader i upptag mellan olika arter och mellan olika utvecklingsstadiet. De uppmätta halterna (i icke sköljd sallad) i

detta försök är dock 10-30 ggr lägre än de som observerats i färdigutvecklad sallad av Codd *et al.* (1999). I de yttre distala bladen uppmättes i den studien 0.88 µg Mcyst/g t.v. och i den basala delen på de centrala bladen (i 'huvudet') 2.5 µg Mcyst/g t.v. Skillnaden kan dock bero på ett flertal olika faktorer som t.ex. att salladen i den undersökningen var betydligt äldre, det fanns makroskopiska algrester kvar på bladytan, exponeringen varade troligen längre, val av analysmetod m.m..

6. Rekommendationer

Denna undersökning visar att microcystin tas upp i sallad och rädisa även vid en kortvarig exponering genom bevattning med vatten med relativt låg microcystinkoncentration. De uppmätta microcystinhalterna i växternas ätliga delar visar att någon risk för akut toxicitet inte föreligger. Möjligen kan microcystin i vegetabilier tillsammans med exponering för microcystin i andra sammanhang medföra en ökad risk för leverskador på lång sikt. Resultaten av denna undersökning ger inte något stöd för rekommendationer om att avstå från att äta unga grönsaker av rädsla för microcystinförgiftning. Vid misstanke om att grönsaken har bevattnats med vatten innehållande microcystiner kan den dock sköljas för säkerhets skull varvid större delen av toxinerna avlägsnas om det finns på växytan.

Endast ett fåtal studier om hur cyanotoxiner tas upp i och ackumuleras i kärlväxter har gjorts. Det finns därför ett stort antal frågeställningar som förtjänar uppmärksamhet i framtida studier. Ett viktigt område är att fastställa om det största upptaget sker via rötter eller blad och hur upptagsmekanismerna ser ut. Kännedom om transporten av microcystin i växten till olika delar som rotknölar, stjälk, blad, frön, baljor o.s.v. bör undersökas eftersom det har stor betydelse för att undvika risken att konsumera delar av växten som potentiellt kan innehålla höga halter av microcystin. Skillnader mellan olika växtarter och -familjer är av stort intresse för att kunna ge en bild över den totala exponeringen för microcystiner vid konsumtion av vegetabilier. Exponeringstidens betydelse för mängden upptaget microcystin och halterna av microcystin i skördemogna växter bör studeras. Likaså bör försök genomföras med exponering av olika koncentrationer microcystin för att fastställa dos-responskurvor för olika arter och delar av växten. Likaså bör microcystiners biologiska stabilitet fastställas för att kunna ge besked om hur snart efter en bevattning med microcystinhaltigt vatten som skörden kan ske. Microcystiners stabilitet vid behandling, tillagning, förvaring m.m. innan konsumtion är också av stor betydelse för exponeringsbilden och hur stor risken är för eventuella hälsoproblem. Ovanstående gäller

i första hand för skandinaviska förhållanden men kan även överföras till många tropiska och subtropiska områden, där toxiska vattenblomningar förekommer betydligt oftare och under en större del av året än i tempererade områden.

Tack

Jag vill särskilt tacka Monica Ferm och Tord Möller med kollegor på Livsmedelsverket i Uppsala för lån av utrustning och för att de med stort tålamod och visat intresse hjälpt mig med praktiska frågor kring analysarbetet med ELISA metoden. Jag vill också tacka för trevligt sällskap under tiden med analysarbetet.

Jag vill också tacka följande personer som hjälpt mig på olika sätt under arbetet:

Gunnel Ahlgren för hjälp med att samla in provvatten, allmän rådgivning samt för synpunkter på manuskriptet

Bengt Lundegårdh med kollegor på Trädgårdsförsöksstationen, SLU, Uppsala, för hjälp med att sätta upp odlingssystemet och val av näringslösning, visat intresse och en dryg månad i mycket gott sällskap.

Mats Aronsson, Thorslunda Växthus AB, för studiebesök vilket gav både praktiska råd inför odlandet och bra bakgrund till hur kommersiella växthus drivs.

David Wästlund för en mycket god förevisning av hur ELISA-testen bör genomföras samt påpekande av vilka vanliga felkällor som kan förväntas.

Jan Örberg för stöd och bra synpunkter på manuskriptet.

Personalen på avdelningen för organisk miljökemi på institutionen för miljöanalys för all hjälp med att leta efter kemikalier och för lån av utrustning och annan materiel.

Sist men inte minst vill jag tacka min handledare Eva Willén för handledning, uppmuntran, konstruktiva förslag, bakgrundslitteratur och stor entusiasm under hela arbetets gång.

Referenser

- Abe, T., Lawson, T., Weyers, J. & Codd, G., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist* 133:651-58.
- Annadotter, H. & Cronberg, G., 1994. Toxinproduktion vid blomning av blågröna alger (cyanobakterier). *Vatten* 50:299-303.
- Beckers, W., muntligt, nutritionist, näringsenheten, Uppsala, Statens Livsmedelsverk.
- Bergmann, W., 1992. *Nutritional Disorders of Plants. Development, Visual and Analytical Diagnosis.* Gustav Fischer, Jena, Germany, pp. 333-52.
- Blomqvist, P., Pettersson, A. & Hyenstrand, P., 1994. Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Archiv für Hydrobiologie* 132(2):141-64.
- Carmichael, W.W., 1994. The Toxins of Cyanobacteria. *Scientific American* 270(1):64-72.
- Chorus, I. & Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.* WHO, E & FN Spon, St Edmundsbury Press, Suffolk.
- Codd, G., Metcalf, J. & Beattie, K., 1999. Retention of *Microcystis aeruginosa* and microcystin by sallad lettuce (*Lactuca sativa*) after spray irrigation with water containing cyanobacteria. *Toxicon* 37:1181-85.
- Chu, F., Huang, X. & Wei, R., 1990. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Microcystins in Blue-Green Algal Blooms. *Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73(3): 451-56.
- Kurki-Helasma, K. & Merilouto, J., 1998. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Toxicon* 36, nr 12.
- Hult, A., Beckman-Sund, U., Möller, T., Willén, E. & Erlandsson, B., 1997. Algtoxiner i sjö- och dricksvatten. Livsmedelsverket, rapport 19/1997.
- Ito, E., Kondo, F., Terao, K. & Harada, K.I., 1997. Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR. *Toxicon* 35:1453-57.
- Lambert, T.W., Holmes, C.F.B. & Hrudehy, S.E., 1994. Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environ. Rev.* 2:167-86.
- Lundegårdh, B., Agr.dr., Trädgårdsförsöksstationen i Uppsala, inst. för ekologi och växtproduktionslära, SLU.
- MacKintosh, C., Beattie, K., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G., 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS 08427)*, 264(2):187-92.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants.* 2nd ed. Academic Press, London, pp. 184-200, 242-54, 299-312.
- Naturvårdsverket, 1993. Miljön i Sverige '92 tillstånd och trender: Eutrofiering av mark, sötvatten och hav. Ansv. utg. Ingvar Bingman. Rapport 4134.
- Naturvårdsverket, 1999. *Bedömningsgrunder för miljö kvaliteten: Sjöar och vattendrag.* Bakgrundrapport: Biologiska parametrar 2. Rapport 4921.

- Pettersson, S., 1986. Growth, contents of K⁺ and kinetics of K⁺ (86Rb) uptake in barley cultured at different low supply rates of potassium. *Physiology of Plants* 66:122-28.
- Rivasseau, C., Racuad, P. & Hennion, M-C., 1999. Evaluation of an ELISA Kit for the Monitoring of Microcystins (Cyanobacterial Toxins) in Water and Algae Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, vol. 33(9):1520-27.
- Sundh, U. B., 1997. Alger- cyanobakterier som kan orsaka problem. *Vår Föda* 1:11-14.
- Skulberg, O., 1991. Akersvatnet. Blågrönalger – vannkvalitet, Resultater av undersökelse i 1989 og 1990. NIVA- Rapport 2646, ISBN 82-577-1952-8.
- Stoltz, E., supervisors Codd, G. & Weyers, D., 1998. Effects of Microcystin-LR on Higher Plants. Examensarbete (20 p) vid Dep. of Biological Sciences at Uni. of Dundee och Inst. för Natur och Miljö vid Högsk. i Karlstad.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplanktonmetodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung der Limnologie*, 9:1-38.
- Wilander, A., Johnson, R., Goedkopp, W. & Lundin, L., 1995. Riksinventering 1995: En synoptisk studie av vattenkemi och bottenfauna i svenska sjöar och vattendrag. Naturvårdsverket, rapport 4813.
- Willén, E. & Ahlgren, G. & Söderhielm, A-C., 1999. Toxic cyanophytes in three Swedish lakes. *Internationale Verhandlungen für theoretische und angewandte Limnologie* 37 (Accepted for publication).
- Willén, T. & Mattsson, R., 1997. Water-blooming and toxin-producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995. *Hydrobiologia* 353:181-92.
- Willén, T. & Tirén, T., 1984. Lilla Ullfjärden – en sjöbeskrivning. Naturvårdsverket, rapport 1769, ISBN 91-7590-147-1.
- Willén, E., Willén, T. & Ahlgren, G., 1995. Skadliga cyanobakterier och alger i svenska sjöar. I skadliga alger i sjöar och hav. Naturvårdsverket, rapport 4447, pp. 46-91.

Bilaga 1. Odlingsbilder



Fig. 1. (överst till vänster). Sallad odlad på jordmedium (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.



Fig. 2. (överst till höger). Raddisa odlad på jordmedium (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.



Fig. 3. (mitten till vänster). Sallad odlad i hydrokultur (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.

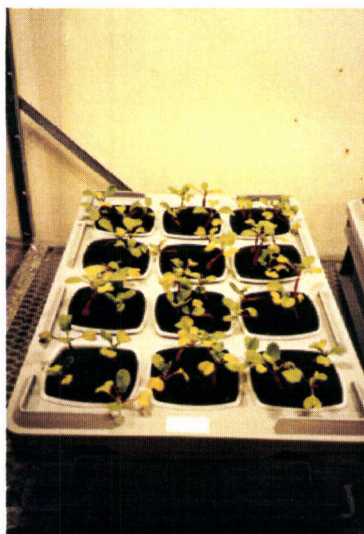


Fig. 4. (mitten till höger). Raddisa odlad i hydrokultur (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.

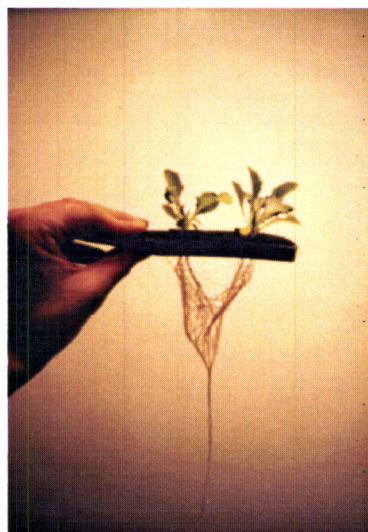


Fig. 5. (nederst till vänster). Sallad odlad i hydrokultur (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.

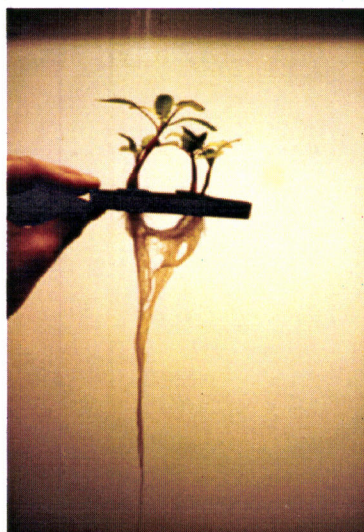


Fig. 6. (nederst till höger). Raddisa odlad i hydrokultur (23 dagar gammal), exponerad för 8 µg Mcyst/l i 14 dagar.