

Blågrønnalgetoksin — Påvisning og eigenskapar

Av Bjarne Underdal

Bjarne Underdal er professor ved Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges Veterinærhøgskole.

*Innlegg på møte i Norsk Vannforening
1. oktober 1984.*

Gjennom det forsknings- og kartleggingsprogram som er borte fram i samarbeid mellom Institutt for næringsmiddelhygiene og Norsk Institutt for vannforskning er det vist at i Skandinavia kan vi så langt kontatera at fylgjande arter forekjem med toksinproduserande stammer:

Anabena flos-aquae
Anabena spiroides
Aphanizomenon flos-aquae
Gomphoshaera lacustris
Microcystis aeruginosa
Microcystis wesenbergii
Nodularia spumigena
Oscillatoria agardhii (3 undergrupper)
Oscillatoria rubescens var.

Av desse er det *Anabena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, og *Oscillatoria*-artene som representerer det største problemkomplekset.

PÅVISING AV TOKSIN

Forbehandling

Toksina som einskilde arter og stammer av blågrønnalger dannar, er å oppfatta som sekundære metabolittar som dannast inni cella og som først vert frigitt frå cella når denne skadast eller dør (lyserar). For at toksinet skal kunna påvisast i det biologiske testsystem som nyttast i dag,

må prøvematerialet, enten det er frå ei naturleg oppblomstring eller frå oppdyrka materiale (klon), konsentrerast (sedimentering, siling, sentrifugering) og frysetørkast. Ved denne behandlinga vert celleveggen i stor grad øydelagd, og toksina tilgjengelege ved ekstraksjon. Oppbevaring av det frysetørka materialet skjer i lufttette glass, mørkt og tørt. Med ei slik behandling og lagring har toksinkonsentrasjonen (toksintiteret) halda seg konstant i fleire år.

Toksineksstrasjon

For den biologiske testinga (akutt toksisitetstesting) ekstraherast toksina i steril 0,9% NaCl løysing. Vanleg utgangskonsentrasjon er 50 mg frysetørka materiale pr. ml fysiologisk koksalt. Etter omrøring fleire gonger i løpet av 30 min. sentrifugerast suspensjonen ved 3—4000 g i 10 min. Supernatanten nyttast i den vidare underøkninga. Med denne metoden får ein ut ca. 50% av toksinmengda i cellematerialet.

Akutt toksisitetstesting

Testing av akutt toksisitet vert utført ved intraperitoneal (i bukhol) injeksjon på hunnus (20—25 g). Vi nyttar 1,0 ml ekstrakt (evt. suspensjon) og 2 dyr i kvar gruppe. Ekstraktet (suspensjon) fortynnast, som regel i to-folds fortynningsrekke, for å klarleggja toksintiteret.

Toksininholdet vert uttrykt i museeinheiter (ME) pr. gram frysetørka materiale

(1 ME er definert som den minste mengde som må til for å ta livet av ei 20 g. mus i løpet av 4 timar), eller som MLD₅₀ evt. MLD₁₀₀ (minimum dose, i mg/kg kroppsvekt, som tek livet av henholdsvis 50 og 100% av forsøksdyra).

Symptombiletet ved injeksjon av dødelege dosar ekstrakt/suspensjon av *Microcystis* ssp. og *Oscillatoria* spp., og frå skandinaviske lokalitetar også av *Anabena* og *Aphanizomenonae flos-aquae* er nokså likt.

Latensperiode: ca. 20—30 min.

- bleikheit og slappheit
- lammelsar av bakparten
- moderate krampetrekningar

Dødsfall: ca. 60 min. etter injeksjon.

Dødsårsak: hemorhagisk sjokk/respirasjonsstans.

Obduksjonsfunn:

- bleike kadaver
- stor, blodfylt lever
- levercelleskade.

Oppblomstringar av *Anabena flos-aquae* og *Aphanizomenon flos-aquae* frå nord-amerikanske, og nå også australske lokalitetar visar eit anna symptombilete på forsøksdyr:

Latensperiode: 1—2 min.

- lammelse
- skjelvingar
- uttalte krampetrekningar

Dødsfall: 2—10 min. etter injeksjon

Obduksjonsfunn: Ingen.

Metodar som er under utvikling/utprøving.

Eg skal kort omtale nokre andre metodar som er under utvikling internasjonalt, og

der også vårt institutt deltar aktivt i utprøving og tilrettelegging.

Høgtrykksvæskekromatografi (HPLC)

Professor Wayne W. Carmichael ved Wright State University, Ohio har utvikla ein HPLC metode for påvising av toksin frå *Microcystis aeruginosa*. Under eit 14 dagars opphold som professor Carmichael hadde ved NVH/NIVA nyleg, fekk vi høve til å gjera innleiande arbeid med metoden. Eg kan antyda at metoden også synest å kunne nyttast for påvising av det toksiske prinsipp frå *Oscillatoria* spp. I eit forskningsamarbeid med professor Carmichael vil vi innarbeida og utprøva metoden på ulike arter/stammer av *Oscillatoria* og *Microcystis*.

Dei viktigaste stega i metoden:

Frysetørka materiale nyttast

Ekstraksjon med organisk løyingsmiddel

Sentrifugering

Opprensing på minikolonne

Eluering av toksinet

Inntøking av eluatet

Oppløysing i buffer (mobil fase HPLC)

Separasjon på HPLC.

Cellekultur

Vi arbeidar med ulike cellelinjer (HeLa celler, saueNyre-, kalvenyre- og baby hamsternyre-celler). Cellene dyrkast med høvelege medier (næringsløysingar). Sterilfiltrert ekstrakt frå giftproduserande blågrønnalger vert tilsett i ulike konsentrasjonar. Til samanlikning nyttar vi tilsetning av ekstrakt frå ikkje giftproduserande alger. Cellene inkuberast ved 37°C og reaksjon vert avlesen etter 24 timar og etter 7 døgn.

Så langt har det framkomme interessante resultat.

Serologiske metodar

På litt sikt er det moglege at serologiske metodar kan utviklast.

EIGENSKAPAR TIL TOKSINA

Kjemisk/fysikalske

Den kjemiske oppbygging og struktur av blågrønnalgetoksina er berre delvis kjend. Så langt ein kan slutta av forsk-

ningsdata, ser det ut for at fleire av dei aktuelle toksinproduserande artene dannar meir enn eitt toksin. Det tykkjest vidare klart at toksina kjemisk kan delast i 2 hovedgrupper, alkaloid og peptid. Tabellen nedanfor gir ei kort oppsummering av kunnskapane omkring dei mest aktuelle blågrønnalgetoksina i dag.

<i>Art</i>	<i>Toksinnemning</i>	<i>Kjemisk gruppe</i>
Anabena flos-aquae	anatoksin-a	Alkaloid
(ulike toksiske stammer)	anatoksin-b	Ukjend
	anatoksin-c	Peptid
	anatoksin-d	Ukjend
	anatoksin-a (s)	Ukjend
	anatoksin-b (s)	Ukjend
Aphanozomenon flos-aquae	aphantoksin	Alkaloid
Microcystis aeruginosa	microcystin	Peptid
	microcystis type-c	Peptid
Oscillatoria spp.	?	Peptid?

Når det gjeld *Oscillatoria* spp. vart det for første gang påvist i undersøkelser her frå landet i 1980 at denne slekta hadde toksinproduserande arter. Så langt tyder våre undersøkelser på at toksinet (eller kanskje toksina) er av peptid natur. For

microcystin og microcystis type-c består peptidkjeda av 5—7 aminosyrer med molekylvekt på 900—1800 dalton.

Kjemisk/fysikalske eigenskapar som har interesse i vannbehandlingssamanheng framgår av fylgjande oppstilling:

<i>Microcystin</i>	<i>Anatoksin-a</i>
Termostabilt	Termolabilt
Alkalilabilt	Alkalilabilt
Adsorberast på trekull	Adsorberast på trekull
Påverkast ikkje av $Al_2(SO_4)_3$ -flokkulering	Inaktiverast av $Al_2(SO_4)_3$ -flokkulering
påverkast ikkje av klordesinfeksjon	Påverkast ikkje av klordesinfeksjon.

Forsøk som er utført i samarbeid med NIVA visar at ca. 60% av toksinaktiviteten kunne absorberast på aktivt kull.

Ein kan slå fast at vannbehandling som nyttast i Norge i dag ikkje har nokon effekt på toksina fra *Microcystis* og *Oscillatoria*, når desse først er frigjevne frå cellene til dei frie vannmassene.

Toksikologiske eigenskapar.

Som det framgår under amtalen av den akutte toksisitetstestinga har blågrønnalgetoksina dødeleg verknad på mus og også andre forsøksdyr. Fra vårt eige land og utlandet er det beskreve akutt og subakutt forgiftning på ei lang rad dyreartar.

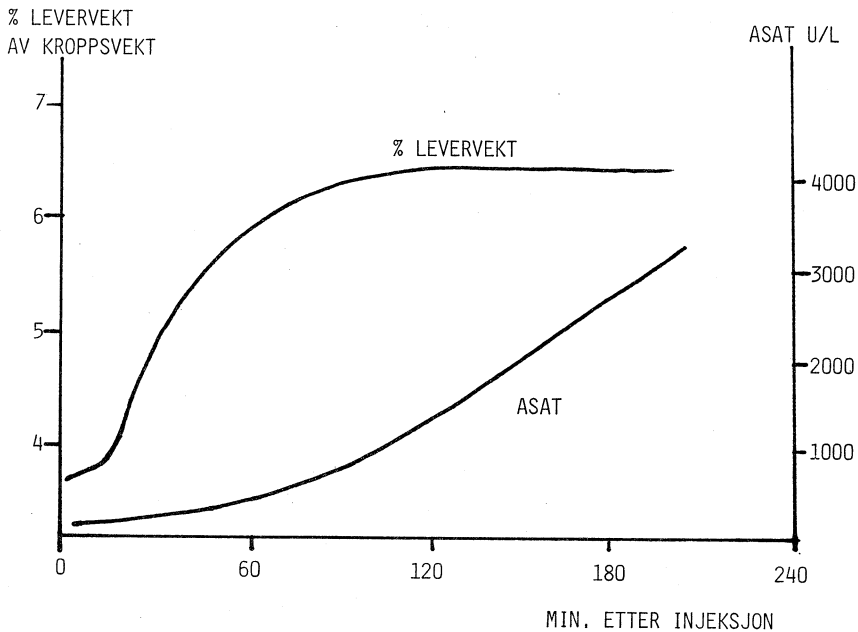
Den toksikologiske virkningsmekanismen til blågrønnalgetoksina er langt frå klarlagd. Men så langt tykkjest det vera haldepunkt for at

* toksin av alkaloid-typen har *neurotoksisk* verknad, (blokkerar impulsføringa frå nerve til muskel)

* toksin av peptid-typen har *hepatotoksisk* verknad (fører til skade av levercellene, enzymlekasje, sterk opphoping av blod, og som fylgje av dette hemoragisk sjokk).

Som eit eksempel på den hepatotoksiske verknaden er det i Figur 1 vist effekten på levervekt og leverenzymlekasje til blodet etter injeksjon av ekstrakt frå *Microcystis aeruginosa* (etter Østensvik et al. 1981).

På basis av cellecturstudier er det holdepunkt for at ekstrakt fra giftige blågrønnalger har skadeleg verknad på fleire typar pattedyrceller.



FIGUR 1

In vitro mutagenetesting (Ames' test) har vist at hverken ekstrakt av toksinproduserande *Microcystis aeruginosa* eller det reine microcystinet har mutagen verknad.

SITUASJONEN I AKERSVANN

Frå oppblomstring i Akersvann, der *Microcystis aeruginosa* var i dominans, har vi ved biologisk testing funne eit toksininnhold på 4000 ME pr. g frysetørka materiale tilsvarende ein MLD₁₀₀ på 10—15 mg frysetørka materiale pr. kg kroppsvekt. Dette er ved injeksjon i bukhol. Ved inntak gjennom munnen, må dosen multipliserast med ein faktor 8 (for storfe), d.v.s. MLD₁₀₀ i området 80—120 mg/kg. For storfe skulle dette tilseia at eit inntak på 40—60 g algetørrstoff skulle kunna gje forgiftning. Ved vannblomst vil det vera ein gradient i algetettheita frå strandkanten og utover. Data frå Akersvann er under bearbeiding ved NIVA, men frå andre vannblomstsituasjonar t.d. i Frøylandsvatnet, er de tregistret algetettheit tilsvarende 4000 mg algetørrstoff pr. l tett ved land, avtakande til 15 mg i sentrum av innsjøen. Noko tilsvarende er det haldepunkt for i Akersvann. Dette betyr at 15—20 liter «algesuppe» ville vera nok til å gje forgiftning på storfe. Dette er ei vannmengde som ligg på under halvparten

av dagsbehovet til storfe. Ved hjelp av den refererte HPLC metoden har vi saman med professor Carmichael utført ei førebels gransking av frysetørka oppblomstring frå Akersvann, vannprøve frå overflatelaget og frå det aktuelle inntaksdjuget på 11 m. Vi har fått bekrefte at metoden er reproduserbar på oppblomstringar også i norske lokalitetar og kan nemna at

- * i oppblomstringskiltet har vi holdepunkt for at toksin er tilstades fritt i vannmassen
- * i prøve frå inntaksdjuget har vi ikkje fått utslag som tyder på at toksin er tilstades i vannet.

Eg må understreka at det er reint førebels resultat eg her har referert, og at det ligg omfattande og interessant forskningsarbeid framfor oss. Vi må gjennom det vidare forskningsarbeidet finna svar på spørsmål som knyter seg til m.a.

- * utløyising av toksinproduksjon
- * stabiliteten av toksina i vannforekomsten
- * akkumulering av toksina i næringskjeda
- * moglege langtidsvirknader av toksina.