

# Cyanobakterier og produksjon av bioaktive stoffer

Av Øyvin Østensvik og Bjarne Underdal

Forfatterne arbeider ved Fagseksjon for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole.

## Sammendrag

Cyanobakterier produserer et mangfoldig spekter av kjemiske forbindelser med biologisk aktivitet. Størst oppmerksomhet er rettet mot de bioaktive forbindelsene som har toksinvirkning på dyr og mennesker. Forekomst av disse cyanotoksinene i vann og næringsmidler kan gi giftvirkninger. Ved kvantitativ påvisning av toksinene benyttes standarder framstilt fra oppdyrkede organismer. Bioaktive stoffer med toksisk effekt på cellekulturer, virus, sopp og bakterier (cytotoksiner) har fanget interesse i farmasøytiske miljøer. Slike stoffer kan danne utgangspunkt for framstilling av legemidler. Egne undersøkelser har dokumentert at ekstrakter fra cyanobakterier i kultursamlingen ved Norsk institutt for vannforskning, NIVA, har antibakterielle egenskaper. For videre identifisering av ulike kjemiske komponenter i ekstraktene er det nødvendig med fraksjonering og opprensing. Cyanobakterier er en aktuell kilde for «nye» bioaktive stoffer, og algekulturteknologien vil

være et viktig verktøy for produksjon av slike stoffer i større skala.

## Innledning

Det er en økende aktivitet innen området isolering og framstilling av biologisk aktive stoffer fra naturlige kilder, blant annet mikroalger(1) og høyere planter (2). Flere arter av mikroalger som tilhører gulalger, grønnalger, kiselalger og blågrønnalger (cyanobakterier), har evne til produksjon av stoffer som gir biologiske effekter (1,3). En viktig gruppe bioaktive stoffer er potente toksiner, og best beskrevet er cyanotoksinene (toksiner produsert av cyanobakterier). Cyanotoksinene kan inndeles i to hovedgrupper; *biotoksiner* og *cytotoksiner* (4). Denne inndelingen er basert på hvilke typer biotester som benyttes for å synliggjøre toksinvirkninger. Biotoksinene kan forårsake forgiftninger med dødelig utgang hos flercellede organismer, herunder pattedyr og mennesker. Biotester basert på dyr; mus og akvatiske invertebrater er benyttet. Cytotoksinene viser effekter

i biotester som omfatter enkeltceller eller cellegrupper. De cytotoxiske effektene kan være rettet mot mikroorganismer (virus, sopp og bakterier) eller cellekulturer (f. eks. kreftceller). Veldokumenterte effekter overfor forskjellige mikroorganismer og kreftceller har ført til at cytotoksiner inngår i flere farmasøytiske selskapers arbeid med utvikling av nye legemidler.

## Biotoksiner

Biotoksiner produsert av cyanobakterier er potente giftstoffer. Det er beskrevet flere typer biotoksiner, og de fleste av dem tilhører gruppene hepatotoksiner og nevrotoksiner (5).

Hepatotoksiner virker spesifikt mot leverceller, og microcystiner er best beskrevet. Microcystiner er sykliske heptapeptider med molekylvekter fra 900-1100 d. Akutt toksisitet ( $LD_{50}$ , ip, mus) er angitt fra 60-250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . I forskjellige eksperimentelle systemer er det vist at microcystiner kan medvirke til utvikling av kreft. Som en følge av dette vil det være nødvendig å gjennomføre flere undersøkelser for å klarlegge eventuelle langtidseffekter av disse toksinene.

Nevrotoksiner angriper nerveceller, og anatoksin-a er en typisk representant for gruppen. Anatoksin-a er et toksin av alkaloid-typen med angitt akutt toksisitet ( $LD_{50}$ , ip, mus) fra 20-200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Flere grupper av biotoksiner er påvist i norske og utenlandske vannforekomster som benyttes til drikkevann. Undersøkelser tyder på at

akvatiske organismer som lever i slike vannforekomster kan akkumulere toksiner. Toksinproduserende cyanobakterier kan derfor utgjøre en potensiell helsefare for dyr og mennesker. På bakgrunn av foreliggende toksikologiske data har Verdens helseorganisasjon, WHO, anbefalt en foreløpig grenseverdi på 1  $\mu\text{g}/\text{l}$  for ett av biotoksinene, microcystin LR, i drikkevann.

Overvåking av vannkilder for innhold av biotoksiner og gjennomføring av en risikovurdering knyttet til bruk av slike vannkilder til forskjellige formål forutsetter kvantitative undersøkelser av toksininnhold i vann og akvatiske organismer. Kvantitative analyser baseres på bruk av veldefinerte standarder med kjent toksininnhold. For å framskaffe standarder av cyanotoksiner er algekulturteknologi ett av hjelpemidlene.

Undersøkelser foretatt av cyanobakterier fra Steinsfjorden i Buskerud inneholdt flere biotoksiner (6). En microcystinvariant, 3-demethyl-microcystin LR, dominerte i planktonmateriale fra denne lokaliteten. Planktonsamfunnet var dominert av cyanobakterier tilhørende slekten *Planktothrix*. Det viste seg umulig å framskaffe kommersielt tilgjengelige standarder for dette toksinet. *Planktothrix* spp. isolert fra Steinsfjorden ble dyrket i kultur på NIVA. Kulturene produserte også 3-demethyl-microcystin LR, og fra frysetørket oppdyrket materiale ble det framstilt en standard av dette toksinet. Denne standarden ble benyttet ved kvantitative undersøkelser av toksininnhold i fisk fra Steinsfjorden (6).

Våre erfaringer med kvantitative undersøkelser for biotoksiner understreker behovet for å øke tilgjengeligheten av veldefinerte standardmaterialer. Den muligheten som ligger i bruk av alge-kulturteknologi til dette formålet bør videreføres.

## Cytotoksiner

Borowitzka (1) og Patterson m. fl. (7) beskriver flere mikroalger med evne til produksjon av cytotoksiske stoffer. Cytotoksiner er ikke toksiske overfor dyr, men cytotoksiske effekter er dokumentert i en lang rekke *in vitro* biotester (4). Slike tester omfatter cellekulturer med pattedyrceller, i første rekke kreftceller, og mikroorganismer med forskjellige typer bakterier, sopp og virus. Det er imidlertid stor forskjell på dokumenterte effekter *in vitro* og registrerte effekter *in vivo*. Borowitzka (1) beskriver 385 ekstrakter med antibakteriell effekt *in vitro*. Bare 11 av disse (3%) hadde antibakteriell effekt *in vivo*.

I det siste tiårene har det vært lett etter cytotoksiske stoffer med effekt på kreftceller og virus. Cytotoksinet cryptophycin-1, produsert av *Nostoc* sp., har vist god *in vivo*-effekt mot tumorer. En syntetisk analog, cryptophycin-52, er nå til klinisk utprøving mot kreftsjukdom på menneske (8). Cyanovirin-N, produsert av *Nostoc ellipsosporum*, viser antiviral effekt overfor HIV-virus *in vitro* (9).

Disse eksemplene illustrerer at påviste cytotoksiner kan danne grunnlag for produksjon av legemidler. Ved

screeningundersøkelser av bioaktive stoffer fra cyanobakterier har det vist seg at påvisning av «nye» stoffer forekommer oftere enn fra andre mikroorganismer, f. eks. aktinomyceter(4). Cyanobakterier blir sett på som organismer med et godt potensiale for å framskaffe «nye» farmakologisk aktive stoffer.

## Egne undersøkelser

Gjennom et samarbeid mellom Norges veterinærhøgskole og NIVA har ekstrakter fra cyanobakterier blitt undersøkt for antibakterielle effekter (10). Antibakterielle effekter synliggjøres i biotester der bakterier er testorganismer. Vann- og metanolekstrakter er undersøkt i 6 forskjellige biotester. Til nå er 43 kulturer undersøkt, og det er påvist antibakteriell effekt i 33 av dem. Vann- og metanolekstrakter fra cyanobakterier har gitt antibakterielle effekter i 5 av 6 ulike bakterietester (Tabell 1). De mest følsomme bio-tes-tene har vært basert på bakteriene *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis* og *Bacillus cereus*. Ingen av de undersøkte cyanobakterieekstraktene har vist antibakteriell effekt i biotetsen basert på *Micrococcus luteus*. Denne testbakterien var imidlertid følsom for fire veldefinerte antibakterielle stoffer som er i terapeutisk bruk (10). Disse observasjonene tyder på at ekstraktene fra de undersøkte cyanobakteriene kan inneholde andre bakteriehemmende stoffer enn de fire terapeutiske stoffene. Cyanobakterieekstraktene viste dessuten forskjellige antibakterielle effekter

**Tabell 1.**  
**Antall vann- og metanol-**  
**ekstrakter fra 43**  
**cyanobakterier med påvist**  
**antibakteriell effekt**

Testsystem	Type ekstrakt	
	Vann	Metanol
ML/MH	0	0
BS/M5	7	22
BS/M8	6	16
BC/M8	13	27
AH/M8	10	27
EC/TA6	0	5
Sum	36	97
Totalt	258 (14%)	258 (38%)

ML/MH: *Micrococcus luteus* innstøpt i Mueller Hinton Agar  
 BS/M5: *Bacillus subtilis* innstøpt i Antibiotic Medium 5 (pH 7.9)  
 BS/M8: *Bacillus subtilis* innstøpt i Antibiotic Medium 8 (pH 5.85)  
 BC/M8: *Bacillus cereus* innstøpt i Antibiotic Medium 8  
 AH/M8: *Aeromonas hydrophila* innstøpt i Antibiotic Medium 8  
 EC/TA6: *Escherichia coli* Bayer innstøpt i Testagar pH 6.0

overfor testbakteriene. De 33 kulturene med antibakteriell effekt fordelte seg på 18 forskjellige mønstre. Disse observasjonene kan tyde på at ekstraktene inne-

**Tabell 2.**  
**Antibakteriell effekt av ekstrak-**  
**ter fra 27 kloner av toksiske og**  
**ikke-toksiske cyanobakterier.**

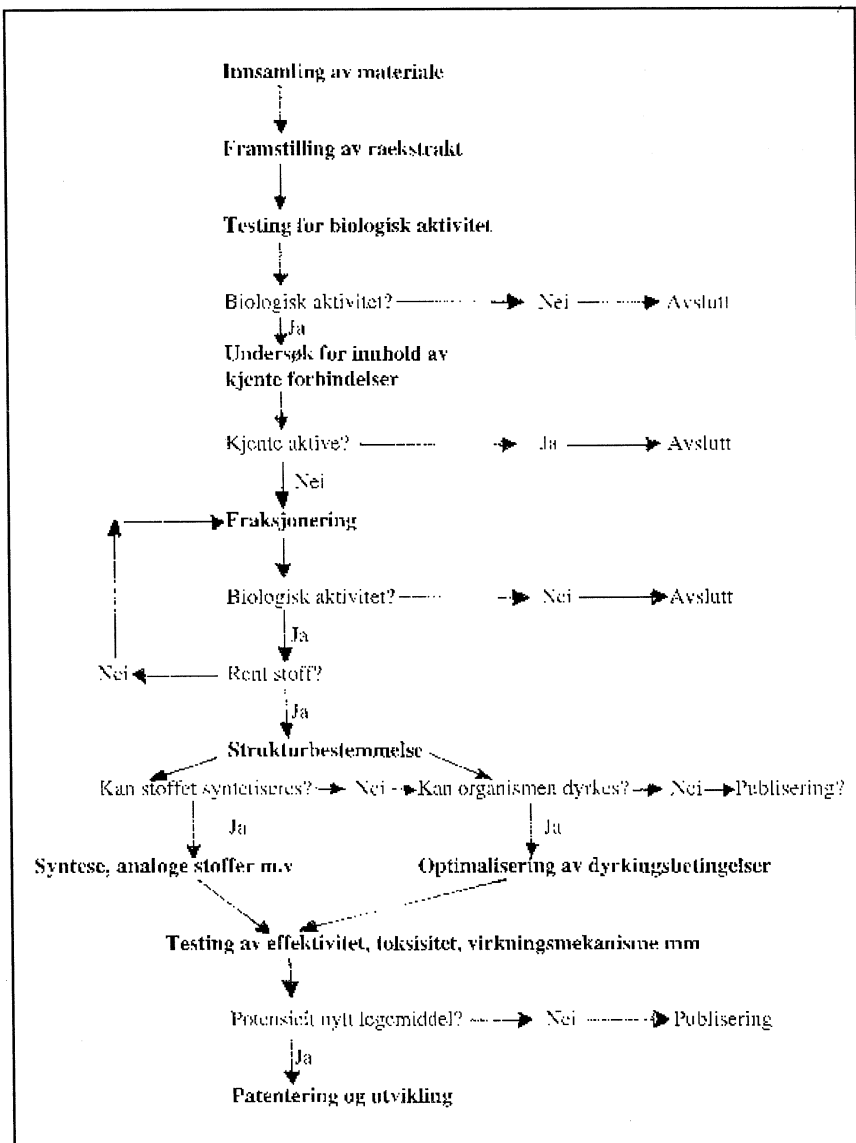
Toksisitet	Antibakteriell effekt	
	Positiv	Negativ
Toksisk (n=18)	13	5
Ikke-toksisk (n=9)	4	5

holder flere kjemiske forbindelser med antibakteriell aktivitet.

Effekten av ekstraktene er også sammenlignet med standarder av cyanotoksinene tubercidin og microcystin LR og RR. Disse toksinene viste ingen tydelig effekt i bakterietestene (10). Foretatte undersøkelser over antibakterielle egenskaper i ekstrakter fra 27 definerte kloner av biotoksiske og ikke-biotoksiske cyanobakterier tyder på at det ikke er noen klar sammenheng mellom produksjon av biotoksiner og produksjon av stoffer med antibakteriell effekt (Tabell 2). Det synes derfor som om bioaktive stoffer med antibakteriell effekt virker på en annen måte enn de undersøkte cyanotoksinene.

## Kommersielt potensiale

Ved hjelp av algekulturteknologi kan mikroalger dyrkes i tilstrekkelige mengder til undersøkelser for produk-



Figur 1. Flytskjema som viser en framgangsmåte ved undersøkelse for bioaktive stoffer fra mikroalger (Etter: Borowitzka, 1995).

sjon av bioaktive stoffer. Fra et undersøkt råekstrakt med biologisk aktivitet er det imidlertid en lang vei fram til framstilling av et produkt som kan ha kommersiell interesse. En skisse som viser en mulig framgangsmåte er gjengitt i Figur 1. Det er mange muligheter for å falle fra underveis, men potensialet for å oppdage «nye» stoffer er til stede. På veien gjennom flere fraksjonerings, separeringer, opprensinger, isolasjon og utprøving av rent stoff kan flere forhold gjøre seg gjeldende:

- Påvist og isolert stoff er kjent fra før.
- Stoffet kan ha god effekt *in vitro*, men dårlig effekt *in vivo*.
- Stoffet kan ha for store bivirkninger til at en terapeutisk anvendelse er aktuell.

Farmasøytisk industri søker etter nye substanser og kjemiske strukturer som kan danne grunnlag for framtidige legemidler. Undersøkelser av cyanobakterier og andre mikroalger kan danne grunnlag for påvisning av cytotoxiner med kommersiell interesse. I en slik sammenheng vil algekulturteknologi være et viktig verktøy.

## Avslutning

Algekulturteknologi kan benyttes til masseproduksjon av mikroalger. Biologisk aktivitet i råekstrakter kan lede til påvisning og framstilling av kjemiske stoffer og strukturer som kan utnyttes kommersielt. Egne undersøkelser har vist at en rekke cyanobakterier i kultur har evne til produksjon av stoff

fer med antibakteriell effekt. En videreføring av dette arbeidet vil omfatte fraksjonering og identifisering. Dette vil bidra til å kartlegge det potensialet som ligger i cyanobakterier som kilde til nyttige biologisk aktive stoffer.

## Referanser

1. Borowitzka, M.A. 1995: Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biological active compounds. *Journal of Applied Phycology* 7: 3-15.
2. Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S. og Bollinger, W.H. 1985: Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. *Science* 228: 1154-1160.
3. Metting, B. og Pyne, J.W. 1986: Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 386-394.
4. Carmichael, W.W. 1992: Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 445-459.
5. Underdal, B. og Østensvik, Ø. 1998: Cyanobakterier og drikkevannshygiene. *Norsk veterinærtidsskrift*, 110 (10): 656-661.
6. Underdal, B., Hormazabal, V., Skulberg, O.M., Østensvik, Ø. og Aune, T. 1998: Cyanotoksiner og fisk - toksinproduserende blågrønnalger i Steinsfjorden. Norges veterinærhøgskole, Institutt for farmakologi, mikrobiologi og

næringsmiddelhygiene. Norsk institutt for vannforskning. Oslo, 26. juni 1998. Rapport 18 s.

7. Patterson, G.M.L., Larsen, L.K. og Moore, R.E. 1994: Bioactive natural products from blue-green algae. *Journal of Applied Phycology* 6: 151-157.

8. Moore, R.E. 1998: Bioactive compounds from cyanobacteria. I: *Compilation of Abstracts, 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Beaufort, North Carolina, USA.

9. Boyd, M.R. et al. 1997: Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbiocide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:1521-1530.

10. Østensvik, Ø., Skulberg, O.M., Underdal, B. og Hormazabal, V. 1998: Antibacterial properties of extracts from planktonic freshwater cyanobacteria - a comparative study of bacterial bioassays. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1117-1124.