

Risikovurdering av cyanobakterier i vannkilder som benyttes til drikkevann og rekreasjonsformål

Av Øyvin Østensvik

Øyvin Østensvik er førsteamanuensis ved Institutt for farmakologi, mikrobiologi og næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole.

Innlegg på Fagtreff 10. september 2001

Innledning

Cyanobakterier (blågrønnalger) påvises regelmessig i norske vannforekomster. I stadig flere lokaliteter er det registrert masseforekomster av disse organismene (Skulberg, 1994). Masseforekomster av cyanobakterier kan gi problemer ved bruk av vannet, økt farge og turbiditet, produksjon av lukt- og smaksstoffer og ulike toksiner. En undersøkelse fra 1986 viste at om lag 60% av cyanobakterie-oppblomstringene i skandinaviske vannforekomster var toksinproduserende (Berg et al. 1986). Cyanotoksinene har effekter overfor ulike organismer, både i og utenfor vannforekomsten. Toksinene deles tradisjonelt inn i to hovedgrupper på grunnlag av hvilket organ i kroppen som angripes; nevrotoksiner (virker på nervesystemet) og hepatotoksiner (virker hovedsakelig på lever). I tillegg produserer cyanobakteriene også endotoksiner av lipopolysakkarid-typen (LPS) og toksiner

av ukjent kjemisk struktur med pro-trahert effekt (Underdal og Østensvik, 1998).

Norsk institutt for vannforskning, NIVA, Norges veterinærhøgskole, NVH, og Folkehelse har i mange år samarbeidet om problemstillinger knyttet til toksinproduserende blågrønnalger. En karakterisering av helserisiko ved forekomst av cyanotoksiner i norske vannkilder bør utføres etter internasjonalt anerkjente metoder. Verdens helseorganisasjon, WHO, har stått sentralt ved utviklingen av metodikk for risikoanalyser. En risikoanalyse består av tre atskilte, men integrerte elementer; risikovurdering, risikohåndtering og risikokommunikasjon (FAO/WHO, 1995, <http://www.who.int/pcs/methodology/ehc/summaries/210.html>). En vitenskapelig basert risikovurdering vil gi forvaltningsmyndighetene det beste grunnlaget for iverksetting av aktuelle tiltak gjennom risikohåndtering og risikokommunikasjon. I denne artikkelen gjennomgås prinsippene i en risikovurdering og prinsippene

blir belyst med eksempler fra norske vannforekomster.

Prinsippene i en risikovurdering

En risikovurdering er bygd opp av fire deler (Tabell 1). En generell beskrivelse av disse fire trinnene er nylig gjort av Aune (2000). Det er viktig å legge merke til at det går et klart skille mellom *fare* og *risiko*. Som eksempel på fare kan nevnes forekomst av cyanotoksiner i en vannkilde. Forekomst av cyanotoksiner kan føre til toksiske effekter. Hvilken sannsynlighet det er for at cyanotoksinene vil utgjøre noen toksikologisk *risiko* vil blant annet være avhengig av de toksiske egenskapene og hvilke mengder (doser) toksin mennesker eller dyr utsettes for. I prosessen fra en identifisering av fare til karakterisering av risiko er det to viktige forhold som må utredes; karakterisering av fare og beregning av eksponering. Karakterisering av fare består i kvalitative og kvantitative evalueringer av skadelige effekter knyttet til forekomst av cyanotoksiner i vann. Det er

nødvendig med kjennskap til toksinenes toksikokinetikk, det vil si hvordan toksinene tas opp av dyr eller menneske, deretter distribusjon, metabolisme og akkumulering/utskillelse av toksin og metabolitter. Videre kreves det kunnskap om toksinenes effekter og virkningsmekanismer. Dessuten er sammenhengen mellom toksindose og toksisk respons viktige data. Ved beregning av eksponering anslås den sannsynlige dose toksin som inntas ved for eksempel konsum av drikkevann eller ved bading. For å angi en sannsynlig dose er det påkrevet med representative kvantitative data for forekomst av cyanotoksiner i vannkildene. Karakterisering av risiko er det siste trinnet i risikovurderingen. Ved å sammenholde dataene om fareidentifisering, toksisitet og eksponering er hensikten med dette trinnet å gi et kvantitativt estimat for sannsynligheten av forekomst av skadelige effekter i en definert populasjon. Innebygget i et slikt risiko-estimat vil det også tas hensyn til usikkerhet knyttet til de anvendte data.

Norsk betegnelse	Engelsk betegnelse
1. Fareidentifisering	Hazard identification
2. Farekarakterisering	Hazard characterization
3. Eksponeringsberegning	Exposure assessment
4. Risikokarakterisering	Risk characterization

Tabell 1: Elementene i en risikovurdering (FAO/WHO, 1995)

Beregning av grenseverdier/TDI (Tolerable Daily Intake)

For cyanotoksinene foreligger det ikke sikre epidemiologiske data for sammenhengen mellom toksindose og skadelige effekter, og beregninger av grenseverdier/TDI må baseres på estimater. Dersom de aktuelle toksinene ikke er gentoksiske er det vanlig å anta at det fins en terskelverdi, og doser lavere enn terskelverdien vil ikke resultere i skadelige effekter. Ved

gjennomføring av eksperimentelle studier defineres enten NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) eller LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level). For å overføre eksperimentelle data fra forsøksdyr til menneske benyttes et sett med usikkerhetsfaktorer. Grenseverdier/TDI vil da bli utledet ved å dividere NOAEL/LOAEL på de anvendte usikkerhetsfaktorene. En oversikt over aktuelle usikkerhetsfaktorer er gitt i Tabell 2.

Variasjon innen en populasjon:	10
Forskjell mellom gnagere og menneske:	10
Forskjell mellom gris og menneske:	3
Kortere eksponering enn livstid:	10
Sparsomme/usikre data:	10
Mulig tumorpromosjon:	3
Ekstrapolering fra LOAEL til NOAEL:	10

Tabell 2. Usikkerhetsfaktorer som benyttes ved beregning av TDI (Tolerable Daily Intake) for cyanotoksiner ut fra NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) eller LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Levels).

For Microcystin-LR foreligger det NOAEL og LOAEL resultater fra peroral eksponering av mus og gris. Et forsøk over 13 uker på mus ga en NOAEL på 40 µg/kg/dag relatert til celleforandringer i leveren og nivåene av spesifikke leverenzymmer i blodplasma (Fawell et al., 1994). Et annet forsøk ble utført på gris (Falconer et al., 1994). Etter 44 dagers forsøksperiode ble det observert en LOAEL på 100 µg/kg/dag. Ved beregning av TDI har WHO tatt utgangspunkt i dataene fra museforsøkene (WHO, 1999).

Når flere usikkerhetsfaktorer skal benyttes samtidig multipliseres de enkelte faktorer med hverandre. Ved beregning av TDI for Microcystin-LR brukte WHO en samlet usikkerhetsfaktor på 1000 (10 for variasjon innen arten, 10 for variasjon mellom ulike arter og 10 for sparsomme/usikre data). Ved å dividere NOAEL-verdien på 40 µg/kg/dag med 1000 ble den anbefalte TDI-verdien 0,04 µg/kg/dag. En voksen person på 60 kg kan ut fra dette innta en dose på 2,4 µg/dag. Det daglige konsumet av drikkevann for

en person på 60 kg anslås til 2 liter. Anbefalt grenseverdi for Microcystin-LR i vann har derfor blitt 1,0 µg/l.

Det framgår av eksempelet ovenfor at avgjørelsen om hvilke sikkerhetsfaktorer som skal tas med ved beregning av TDI vil ha stor betydning for anbefalte grenseverdier. Dersom de toksikologiske dataene hadde vært mer sikre ville grenseverdien være 10 µg/l. Den store innflytelsen usikkerhetsfaktorene har når det gjelder å anbefale grenseverdier for Microcystin-LR peker tydelig på et behov for økt innsats for å framskaffe sikrere toksikologiske data. På den måten kan risikovurderinger bli stadig mer pålitelige. Det har dessuten vært diskutert om det er korrekt å innberegne en ytterligere risikofaktor på 10 for livslang eksponering fra drikkevann. I Norge er masseforekomst av toksinproduserende cyanobakterier sesongbetont og det er tvilsomt om det er riktig å anvende denne risikofaktoren.

Har vi tilstrekkelig kunnskap om cyanotoksinene til å gjennomføre en risikovurdering?

En gjennomføring av risikovurderinger av cyanotoksiner forutsetter at det er tilgjengelig gode toksikologiske data om de aktuelle toksinene. I tillegg må det foreligge kvantitative analysedata for toksinene i den aktuelle vannkilden.

Toksikologiske data for cyanotoksinene er i første rekke tilgjengelige for to toksiner, Microcystin-LR og Cylindrospermopsin. For de andre cyanotoksinene er de toksikologiske

dataene mangelfulle. Selv om toksiner er tilstede er det ikke alltid at toksiske effekter oppstår. Toksiske effekter er avhengig av toksindosen som organismene utsettes for. Når opplysninger om dose-respons sammenhenger ikke er tilgjengelige må det foretas estimeringer. Derfor blir en risikovurdering av andre cyanotoksiner enn de to nevnte forbundet med store usikkerheter. Dette understreker behovet for økt forskningsinnsats for å skaffe nødvendige toksikologiske data. Som eksempel kan nevnes at det dominerende toksinet i Steinsfjorden har vært Microcystin-desmethyl-3-RR. For dette toksinet er det referert data om akutt toksisitet ved intraperitoneal injeksjon på mus (WHO, 1999). Disse dataene (LD₅₀) indikerer at Microcystin-LR er fem ganger så toksisk som Microcystin-desmethyl-3-RR.

Metodikk for kvantifisering av cyanotoksiner er tilgjengelig. Aktuelle metoder er basert på ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay), HPLC (Høytrykksvæskrokromatografi) og LC-MS (Væskrokromatografi og Massepektrometri). Ved vårt laboratorium benytter vi LC-MS for påvisning og kvantifisering av 5 ulike cyanotoksiner (Hormazabal et al., 2000).

Utfordringen framover ligger primært i å framskaffe toksikologiske og organpatologiske data fra eksperimentelle studier med opptak av cyanotoksiner peroralt (gjennom munnen). For de fleste cyanotoksinene vil slike studier være best sammenlignbare med naturlig eksponering gjennom drikkevann og badevann.

Risikovurderinger i forskjellige vannkilder

Avhengig av hvilke typer cyanotoksiner (nevrotoksiner/hepatotoksiner) som påvises i vannkilder som brukes til drikkevann eller rekreasjon må risikoen for akutte og eventuelt kroniske effekter vurderes. Ut fra dagens viten er en risikovurdering av hepatotoksiske cyanobakterier mest aktuelt.

I vannkilder som benyttes til drikkevann vil en risikovurdering først og fremst være knyttet til subakutte og kroniske toksiske effekter. Microcystinens mulige funksjon som tumorpromotor innebærer at risikoen knyttet til langtidseksposering med lave doser må vurderes nøye. Sammenhengen mellom LPS (lipopolysakkarid-endotoksiner) og gastrointestinale symptomer er sannsynliggjort ved epidemiologiske studier. Det er ikke dokumentert denne typen symptomer ved laboratorieforsøk. Mangel på toksikologiske data og kvantitative data om forekomst i aktuelle vannkilder umuliggjør en risikovurdering av denne typen toksiner.

Der det er bade- og rekreasjonsinteresser knyttet til vannkilden vil akutte symptomer i form av hudreaksjoner, allergiske reaksjoner og gastrointestinale symptomer være aktuelle. Disse symptomene settes i første rekke i sammenheng med LPS-endotoksiner, og en risikovurdering vil på grunn av manglende data være umulig. En visuell vurdering med hensyn på masseforekomst av cyanobakterier og kvantitative analysedata for cyanobakteriene er i

dag mest aktuelt å benytte ved en bedømmelse av risiko ved bading i slike vannkilder.

Den enkelte lokalitet danner grunnlag for spesifikke populasjoner med cyanobakterier. Populasjonene er ikke stabile fra år til år; dominerende arter og former kan forandre seg. Følgende undersøkelser knyttet til den enkelte lokalitet er nødvendige for en fareidentifisering:

- Kvalitative planteplanktonundersøkelser gir opplysninger om hvilke cyanobakterier som er tilstede i vannforekomsten.
- Kvantitative planteplanktonundersøkelser gir informasjon om konsentrasjoner av toksinproduserende cyanobakterier i lokaliteten.
- Kvantifisering av cyanotoksiner. Et egnet verktøy ser ut til å være ELISA-metodikk for microcystinene. ELISA-analyser kan utføres lokalt. Disse screeninganalysene bør ved visse intervaller verifiseres med instrumentelle/kjemiske metoder (HPLC/LC-MS).

Det er viktig å være klar over muligheten for at nye toksinproduserende arter kan etablere seg, og at nye toksiner kan dukke opp. Derfor vil biologisk toksisitetstesting (musetest) av cyanobakteriene i mange tilfeller være påkrevet.

De ulike faktorene som påvirker cyanobakterienes toksinproduksjon er det ikke entydig forståelse av. Det pågår forskning, både nasjonalt og internasjonalt, for å gi økt kunnskap om disse sammenhengene.

Sentralt i risikovurderingsmodellen er toksikokinetisk og toksikodynamisk kunnskap. Hvordan toksinene tas opp i ulike organismer, toksinenes metabolisme, akkumulering og utskillelse må kjennes. Dagens kunnskap er i hovedsak knyttet til Cylindrospermopsin og et fåtall av de over 50 hepatotoksinene, i første rekke Microcystin LR. For andre cyanotoksiner mangler toksikologiske data bortimot fullstendig. Det foreligger sparsomt med dokumentasjon på toksiske effekter, særlig etter langtidseksponering med lave doser.

Eksponeringsberegninger kan gjøres rimelig bra når det gjelder drikkevann og konsum av akvatiske organismer. Mer usikre beregninger omfatter inntak ved badning og spredning av toksin med aerosoler.

Forskningsbehov

Når en skal gjennomføre en risikovurdering av cyanotoksiner i drikkevann og badevann må den baseres på de kunnskapene som foreligger. Med manglende kunnskap er det åpenbart at en del betraktninger blir estimater. Derfor er det nødvendig med forskning som på sikt kan redusere behovet for estimater.

Relevante temaer for forskningsinnsats:

- Metodeutvikling for fenotypisk og genotypisk karakterisering av cyanobakterier, samt påvisning av toksiske cyanobakterier v.h.a. molekylære metoder (DNA-sekvensering, hybridisering med molekylære prober, spesifikke primere).
- Utvikling av indirekte mål for cyanobakteriekonsentrasjon. Kvantitativ telling er tids- og ressurskrevende. En målsetting om å utvikle enkle metoder i overvåkingsøyemed er relevant. Her kan for eksempel klorofyllanalyse og *in situ* fluorescens være aktuelle.
- Anvendelse av hurtigmetoder for toksinpåvisning. For microcystin-gruppen fins det systemer basert på ELISA-prinsippet. I Norge har vi liten erfaring med disse systemene og hvilken sammenheng det er mellom ELISA-påvist toksininnhold og toksininnhold påvist og kvantifisert instrumentelt/kjemisk.
- Toksikologisk forskning. Sentralt er undersøkelser når det gjelder de toksinene som påvises i norske lokaliteter. Her mangler vi doserespons data, og særlig fra kroniske oraltoksisitetsstudier der organforandringer beskrives (end-point studies).

Avslutning

Denne gjennomgangen har pekt på noen av de sentrale elementene, og gitt eksempler på noen metoder som kan benyttes ved gjennomføring av en risikovurdering. Det bør igangsettes arbeid med en risikovurdering av cyanotoksiner i norske vannforekomster ut fra eksisterende kunnskap. Parallelt med dette er det behov for generering av ny forskningsbasert kunnskap. I denne artikkelen er metodeutvikling for påvisning og karakterisering av toksinproduserende cyanobakterier, påvisning og kvantifisering av cyanotoksiner og toksikologisk forskning beskrevet. Forskningsresultatene vil på sikt bidra til sikrere risikovurderinger. Innledningsvis bør en

egnet lokalitet velges ut, slik at den teoretiske modellen for risikovurderinger kan utprøves i praksis. Pr. i dag peker Steinsfjorden i Buskerud ut som en aktuell lokalitet. Forekomsten av toksinproduserende *Planktothrix* spp. har vært studert i noen år, det har vært utført toksinanalyser av vann, fisk og kreps. Flere brukerinteresser er knyttet til lokaliteten, der bading og konsum av fisk og kreps har vært i fokus. Gjennom en utprøving av risikovurdering vil behovet for kunnskapsutvikling kunne avdekkes og konkretiseres. I Norge vil det etablerte samarbeidet mellom NIVA, NVH og Folkehelse danne en naturlig plattform for videreutvikling av risikovurderinger knyttet til cyanotoksiner.

Referanser

- Aune, T. (2000). Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In: Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millenium. Proceedings from the Xth International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins – 21-25 May, 2000 Guarujá, Brazil. deKoe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. (eds.). W.J. deKoe, Wageningen, NL.
- Berg K., Skulberg, O.M., Skulberg, R., Underdal, B., Willén, T. (1986). Observations of toxic blue-green algae (cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. *Acta Vet Scand* 27: 440-452.
- Falconer, I.R., Burch, M.D., Steffensen, D.A., Choice, M., Coverdale, O.R. (1994). Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *J Environ Tox Wat Qual* 9: 131-139
- FAO/WHO (1995). Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, 13-15 March. WHO, Geneva.
- Fawell, J.K., James, C.P., James, H.A. (1994). Toxins from blue-green algae: Toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. *Water Research Centre, Medmenham, UK*, 1-46.
- Hormazabal, V., Østensvik, Ø., Underdal, B., Skulberg, O.M. (2000). Simultaneous determination of the cyanotoxins anatoxin-a, microcystin desmethyl-3-RR, LR, RR and YR in water using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Liq Chrom & Rel Technol* 23: 3155-3164.
- Nguyen Duy, T., Lam, P.K.S., Shaw, G.R., Connel, D.W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater Cyanobacterial (Blue-Green algal) toxins in water. *Rev Environ Contamin Toxicol* 163: 113-186.
- Skulberg, O.M. (1994). Blågrønnalger – vannkvalitet. Toksiner. Lukt- og smaksstoffer. Nitrogenbinding. Norsk institutt for vannforskning, Oslo. Rapport O-87006.
- Underdal, B., Østensvik, Ø. (1998). Cyanobakterier og drikkevannshygiene. *Norsk veterinærtidsskrift* 110: 656-661.
- WHO (1999). Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Chorus, I., Bartram, J. (eds.). World Health Organization, E & FN Spon, London.