

Научни трудове на ПУ, Plantarum Trav. Sci. Univ. Plovdiv, Plantarum	Год./An. 2006	Том/Vol. 39	Кн./Fasc. 6	с./pp. 17-48
--	------------------	----------------	----------------	-----------------

**TOXINPRODUZIERENDE CYANOPROKARYOTA –
ÜBERSICHT.
CYANOTOXINE – KLASSIFIZIERUNG,
WIRKUNGSMECHANISMEN, IDENTIFIZIERUNGSMETHODEN,
ÖKOLOGISCHES RISIKO**

*Ivanka Teneva^{1,2}, Balik Dzhambazov², Kristin Schirmer¹,
Rumen Mladenov²*

¹ *UFZ, Permoserstr 15, 04318 Leipzig, Germany*

² *Universität Plovdiv, Zar Assen-Str. 24, 4000 Plovdiv, Bulgarien*

ABSTRACT

This review is an attempt to summarize the available information about toxin producing blue-green algae (*Cyanoprokaryota*). A detailed description of the best known cyanotoxins, their mode of action with particular attention to the human health and ecological risks, distribution as well as their detection and quantification by different assays (biological, biochemical, immunological, physicochemical) are presented.

Key words: *Cyanoprokaryota*, cyanotoxins, methods for detection, ecological risk, human health.

1. Allgemeine Charakteristik der Cyanoprokaryota

Cyanoprokaryota sind prokaryotische Algen. Es sind mit den Bakterien verwandte autotrophe Mikroorganismen, Vertreter der ältesten Organismen der Erde, der *Prokaryota*. Die Cyanoprokaryota besitzen gemeinsame Merkmale mit den Eubakterien, sie haben eine feste Zellwand, die Murein enthält, und sind durch das Fehlen eines differenzierten Zellkerns charakterisiert. Andererseits haben die Cyanoprokaryota Photosynthese wie die Rot- und Grünalgen, d.h., sie geben freies O₂ ab (CASTENHOLZ & WATERBURY, 1989). Das bestimmt ihre große Bedeutung für die Entwicklung höherer Organismen auf der Erde. Ihre hohe ökologische Plastizität und die Fähigkeit, ungünstige Bedingungen jahrelang als Sporen zu überleben, ermöglicht ihre kosmopolitische und unspezifische Verbreitung. Blaualgen kommen

in den verschiedensten Biotopen vor – Süßwasser- und Meereshabitate, Böden; in heißen Thermalquellen wie in den Gletschern der Antarktis. Vertreter der Cyanoprokaryota können ökologische Nischen einnehmen, die für andere Algen unzugänglich sind (beispielsweise eine Wassertiefe von 7 bis 15 Metern), und vermeiden auf diese Weise die für die oberen Wasserschichten reiner Gewässer charakteristische Nährstoffkonkurrenz. Die Cyanoprokaryota sind einzellige, koloniale oder fadenförmige Organismen. Einige fadenförmige Gattungen besitzen spezifische N₂-bindende Heterozysten. Ein Teil der Cyanoprokaryotaarten besitzen Gasvakuolen, die ihnen die Möglichkeit bieten, ihre Position im Gewässer zu regulieren, was unzweifelhaft ein Vorteil gegenüber den anderen Planktonarten ist.

Die Vertreter der Cyanoprokaryota produzieren eine Reihe von Sekundärmetaboliten, charakterisiert durch verschiedene biologische Aktivität wie auch Cytotoxizität, Immunsuppression; antifungale, antivirale, enzyminhibitorische oder Cardioaktivität (NAMIKOSHI & RINEHART, 1996). Die von den Cyanoprokaryota gebildete Gruppe von Sekundärmetaboliten umfasst Stoffe, die als Hormone, Antibiotika, Allelochemikalien und Toxine wirken.

Gleichzeitig mit der positiven Rolle in der Ökologie, die die Cyanoprokaryota spielten und spielen, können die Vertreter der Cyanoprokaryota auch eine echte Gefahr für Flora, Fauna und den Menschen darstellen, da ein großer Teil von ihnen hochaktive Toxine bildet, die Cyanotoxine. Bisher wurden 150 Gattungen Cyanoprokaryota mit 2000 Arten festgestellt, von mindestens 40% von ihnen ist die Produktion von Cyanotoxinen bekannt (SKULBERG et al., 1993), wobei die Anzahl von Mitteilungen über nachgewiesene Cyanotoxine im Weltmaßstab ununterbrochen zunimmt. (Abb. 1). Die Cyanotoxine sind Teil der Gruppe der sogenannten „Biotoxine“, die in den Oberflächenschichten von Meeres- und Süßwasserbecken gefunden werden. Seit Jahren werden von allen Teilen des Planeten von Cyanotoxinen verursachte Todesfälle von Säugetieren, Vögeln und Fischen, sowie Erkrankungen von Menschen mitgeteilt (CARMICHAEL, 1988, 1994; BELL & CODD, 1994; RAO et al., 1994; SIVONEN, 1996; HITZFELD et al., 2000). Von der ersten Mitteilung über eine durch Massenentwicklung der Gattung *Nodularia* verursachte Wasserkontaminierung in Australien (FRANCIS, 1878) über die Mitteilung von durch Verschmutzung des Trinkwassers mit Hepatotoxinen verursachten gehäuften Auftreten von Leberkrebsfällen in China, bis zum tragischen Tod von 60 Patienten im Hämodialysezentrum Caruaru in Brasilien, wo bei der Dialyse mit Microcystinen kontaminiertes Wasser verwendet wurde (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA, 1998) – die Liste ist lang und zeigt unzweideutig, welche Gefahr die Cyanotoxine in ökologischer Hinsicht darstellen können.



Abb 1. *Berichte über Cyanoprokaryota „Wasserblühen“ und gemessenen Cyanotoxinen in Gewässern von verschiedenen geografischen Breiten.*

Eine Massenentwicklung von Cyanoprokaryota (sogenannte Wasserblüte) ist die Hauptursache der Kontaminierung von Gewässern mit Cyanotoxinen. Wenn die Umweltbedingungen eine Massentwicklung von Cyanoprokaryota ermöglichen, kann es zu einer gefährlich hohen Konzentration von Cyanotoxinen in den Gewässern kommen. Außer, dass die „Wasserblüte“ zu einer schnellen sichtbaren Toxizität in den betroffenen Organismen führt, beweisen auch eine Reihe von Daten, dass langandauernde und häufige Expositionen bei niedriger Konzentration von Cyanotoxinen zu chronischen Gesundheitsschäden führen können, deren Ursachen in der Folgezeit schwer feststellbar sind. Ein Beispiel dafür ist das in bestimmten Gebieten Chinas häufig festgestellte Vorkommen von niedrigen Konzentrationen des Cyanotoxins Microcystin im Trinkwasser. Es wird angenommen, dass das Microcystin die Ursache für die wachsende Zahl von Leberkrebsfällen unter der Bevölkerung dieser Gebiete ist (CARMICHAEL, 1997).

Leider wurden die zur Häufung von Fällen der Blaualgenmassenentwicklung sowie von Cyanotoxinen führenden Ursachen noch nicht genügend gut untersucht. Es wird angenommen, dass Faktoren wie das Vorkommen von Stickstoff und Phosphor, Temperatur, Licht, Spurenelemente (Fe, Mo), pH-Wert und Alkalität, hydrologische und meteorologische Bedingungen Einfluß auf die Wasserblüte haben. Obwohl gesagt werden kann, dass diese Faktoren direkt mit der Wasserblüte verbunden sind, so gilt das nicht für die Beziehung Zellenanzahl/l – Toxinniveau im Wasser. Einige Autoren meinen, dass eine beispielsweise zur Wasserblüte führende Eutrophisierung der Gewässer grundsätzlich durch lokale Bedingungen bestimmt wird und häufig durch anthropogene Faktoren bedingt ist. Neben den lokalen bestehen auch eine Reihe von globalen Faktoren, die im Weltmaßstab zur Erhöhung der

Cyanotoxingefahr führen. Dazu gehören die globale Erwärmung des Planeten, die eine Wasserblüte begünstigt, sowie die Herausbildung von Megastädten, was zu einer intensiven Nutzung von begrenzten Wasservorräten führt.

2. Cyanotoxine – allgemeine Charakteristik, Klassifizierung

In den meisten Fällen sind die Cyanotoxine Sekundärmetabolite aus dem Stoffwechsel der Cyanoprokaryota, die vorläufig in drei große Gruppen unterteilt werden: Hepatotoxine, Neurotoxine und Dermatotoxine. Die bekanntesten Vertreter der Hepatotoxine sind Microcystine und Nodularine (zyklische Peptide), sowie Cylindrospermopsin, nach der chemischen Struktur ein Alkaloid. Zu den Neurotoxinen gehören die Alkaloide Anatoxin-a, Anatoxin-a(s), Homoanatoxin und Saxitoxine. Als Dermatotoxine werden Lyngbyatoxin und Aplysiatoxin klassifiziert. Nach ihrer funktionellen Wirkung klassifizieren die Autoren die Cyanotoxine als Hepatotoxine, Neurotoxine und Cytotoxine. Außerdem produzieren einige Cyanoprokaryota in geringer Menge die Toxine LPS (Lipopolysaccharide, Endotoxine) und eine Reihe anderer Sekundärmetabolite, die potentiell pharmakologisch genutzt werden können. Nach der biologischen Wirkung und der chemischen Struktur werden die Cyanotoxine in drei Gruppen unterteilt:

- Zyklische Peptide (Hepatotoxine – Microcystine, Nodularin)
- Alkaloide (Neurotoxine – Anatoxine, Saxitoxine)
- LPS – Lipopolysaccharide (Endotoxine)

Die drei toxischsten Cyanoprokaryotagattungen sind *Microcystis*, *Nodularia* und *Oscillatoria*, und die am häufigsten als Toxinproduzenten genannten Cyanoprokaryota-Arten sind *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria* sp., *Aphanizomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae*, *Planctothrix agardhii* und *Lyngbya* sp.

2.1. Toxinproduktion

Obgleich die Umweltbedingungen, unter denen Cyanoprokaryota Toxine produzieren, relativ wenig untersucht wurden, ist die Art der Synthese dieser Toxine etwas klarer. Ihre seltene Aminosäuren enthaltende zyklische Struktur von kleiner Größe zeigt, dass diese Peptide außerhalb der Ribosomen synthetisiert werden (DITTMANN et al., 1997). Die an der außerribosomalen Peptidsynthese teilnehmenden Enzyme – die Peptidsynthetasen - sind modular, und jedes Modul enthält die Information für ein einzelnes Teil der Peptidsynthese.

Molekulargenetische Untersuchungen von toxischen und nichttoxischen Populationen von *Microcystis aeruginosa* zeigen, dass einzig die toxischen Populationen die Gensequenzen für Peptidsynthetasen enthalten. Die Möglichkeit, dass eine Cyanoprokaryotaart Toxine produziert, wird durch die Anwesenheit dieser Gene bestimmt, sowie von ihrem Ausdruck unter bestimmten Umweltbedingungen.

2.2. Cyanotoxine – chemische Struktur, Wirkungsmechanismus

Die **Neurotoxine** (Anatoxine, Saxitoxine) wirken auf die Funktionen des Nervensystems und bewirken häufig einen schnellen Tod, da sie zur Paralyse der Atemmuskulatur führen. Die **Hepatotoxine** (Microcystine, Nodularin, Cylindrospermopsin) sind Gifte, die hauptsächlich die Leber betreffen und schädigen. Bei den betroffenen Organismen tritt der Tod im Resultat der Füllung der Leber mit Blut ein. Dieser Bluterguss führt zu einem fatalen Kreislaufschock, was nach einigen Stunden oder Tagen (abhängig von der Organschädigung) zum Tode führt.

2.2.1. Neurotoxine

Die wichtigsten chemischen Strukturformeln der häufigsten Neurotoxine zeigt Abb.2. Vier Arten von durch Cyanoprokaryota produzierten Neurotoxinen wurden im Detail untersucht: Anatoxin-a, Anatoxin-a(s), Saxitoxine und Neosaxitoxin.

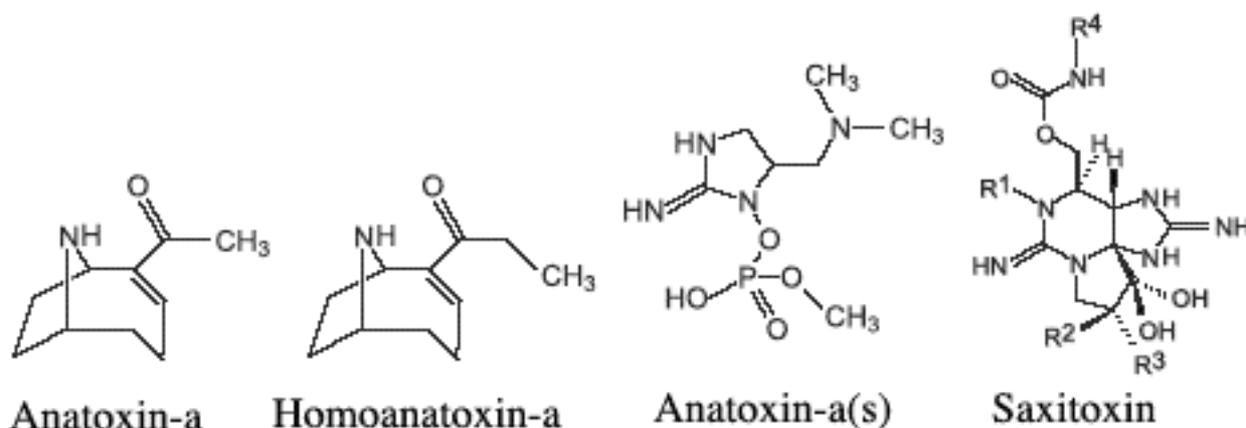


Abb 2. Neurotoxine (Strukturformeln).

Wie es scheint, kommen Anatoxin-a und Anatoxin-a(s) einzig und streng spezifisch nur bei Cyanoprokaryota vor. Die anderen zwei Arten von Neurotoxinen (Saxitoxin und Neosaxitoxin) oder das sogenannte paralytic shellfish poison (PSP) sind unspezifisch und können auch von anderen Organismen produziert werden (Dinoflagellaten), und das häufiger in Salzwasserbecken.

Anatoxin-a. Es ist das erste aus einer Süßwasser - Cyanoprokaryotaart isolierte Cyanotoxin, das chemisch und funktionell definiert ist. Seine Produzenten sind verschiedene Süßwasserarten, wie *Anabaena flos-aquae* und einige andere Arten der Gattungen *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* und seltener *Microcystis* (CARMICHAEL et al., 1975; PARK et al., 1993; SIVONEN, 1996). Seine neurotoxische Wirkung imitiert den Effekt von Azetylcholin mit einer mittleren Letaldosis (LD₅₀) von 200-300 µg/kg Körpergewicht reinem Cyanotoxin, injiziert i.p. bei Mäusen (CARMICHAEL et al., 1975). Normalerweise verbinden sich die Azetylcholinmoleküle getrennt von den Neuronen mit dem Azetylcholinrezeptor der Muskelzellen, wobei sie ein Zusammenziehen der Zellen verursachen. Danach

zersetzt das Enzym Azetylcholinesterase das Azetylcholin, und die Muskelzelle kehrt auf diese Weise in den Ruhezustand zurück. Das Anatoxin-a imitiert die Wirkung von Azetylcholin. Es verbindet sich ebenfalls mit dem Azetylcholinrezeptor der Muskelzellen und ruft eine Kontraktion hervor, kann jedoch nicht durch Azetylcholinesterase oder ein anderes Enzym bei den Eukaryoten abgebaut werden. Die Intoxikationen mit Anatoxin-a bewirken eine Paralyse. Sind die Atemmuskeln betroffen, so werden durch den das Gehirn erreichenden Sauerstoffmangel Konvulsionen hervorgerufen. Bis jetzt ist kein Antidot des Anatoxin-a bekannt.

Homoanatoxin-a ist ein homologes Cyanotoxin des Anatoxin-a mit einer LD₅₀ von 250 µg/kg Körpergewicht, intraperitoneal bei Mäusen injiziert. Es wurde aus der Blaualgenart *Oscillatoria formosa* isoliert und bestimmt (SKULBERG et al., 1992).

Anatoxin-a(s) ist ein natürliches Organophosphat, das aus *Anabaena flos-aquae* und *Anabaena lemmermannii* isoliert wurde (MATSUNAGA et al., 1989). Es ist eine hochtoxische Substanz mit der mittleren Letaldosis (LD₅₀) von 20 µg/kg Körpergewicht, i.p. injiziert bei Mäusen (CARMICHAEL et al., 1990). Bei den behandelten Tieren verursacht es Speichelfluss, was es von den anderen Cyanotoxinen unterscheidet. Die von diesem Cyanotoxin hervorgerufenen Symptome ähneln denen von Anatoxin-a. Anatoxin-a(s) hat jedoch eine andere chemische Struktur als das Anatoxin-a und ruft die für die Intoxikation mit dieser Toxingruppe charakteristischen Symptome durch einen anderen Mechanismus hervor (CARMICHAEL et al., 1994). Während das Anatoxin-a den Abbau von Azetylcholin bei den Neuronen durch dessen Imitation inhibiert, so inhibiert das Anatoxin-a(s) die Azetylcholinesterase. Anatoxin-a(s) wirkt mehr indirekt. Es stört die Verbindung des Azetylcholins mit den Rezeptoren nicht. Bei dieser Verbindung wird eine Kontraktion der Muskelzelle hervorgerufen, aber in der Folge wird die Azetylcholinesterase blockiert, wodurch das Azetylcholin nicht abgebaut werden kann. Im Ergebnis arbeitet der Neurotransmitter ununterbrochen und bewirkt eine Praestimulation der respiratorischen Muskulatur.

Saxitoxine und Neosaxitoxin. Diese beiden Cyanotoxinarten werden von Süßwasserarten der Gattungen *Anabaena* und *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* und *Lyngbya* gebildet (HUMPAGE et al., 1994; CARMICHAEL et al., 1997; ONODERA et al., 1997). Ein großer Teil der Mitteilungen nennt jedoch als Produzenten von Saxitoxinen und Neosaxitoxin Dinoflagellaten – Salzwasser-algen, die die sogenannte „rote Wasserblüte“ hervorrufen. Tatsache ist, dass alle Neurotoxine die Funktionen des Nervensystems schädigen, indem sie die „Kommunikation“ zwischen Neuron und Muskelzelle stören, jedoch auf verschiedenen Wegen. Saxitoxine und Neosaxitoxin unterbrechen die Übertragung des Nervenimpulses durch Verhinderung des freien Übertritts von Na⁺ in die Neuronen und Blockierung der Nervenkanäle. Im Ergebnis werden die Muskelzellen nicht stimuliert, und es tritt Paralyse ein.

2.2.2. Hepatotoxine

Während die cyanoprokaryotische Neurotoxine als Verursacher von Todesfällen von Tieren und Intoxikationen von Menschen besonders in Nordamerika, Großbritannien, Australien und den skandinavischen Ländern festgestellt wurden, so wird die andere große Gruppe von Cyanotoxinen, die Hepatotoxine – Microcystine, Nodularin, Cylindrospermopsin (Abb. 3) mit Vorfällen von Intoxikationen buchstäblich von jedem Punkt des Planeten verbunden.

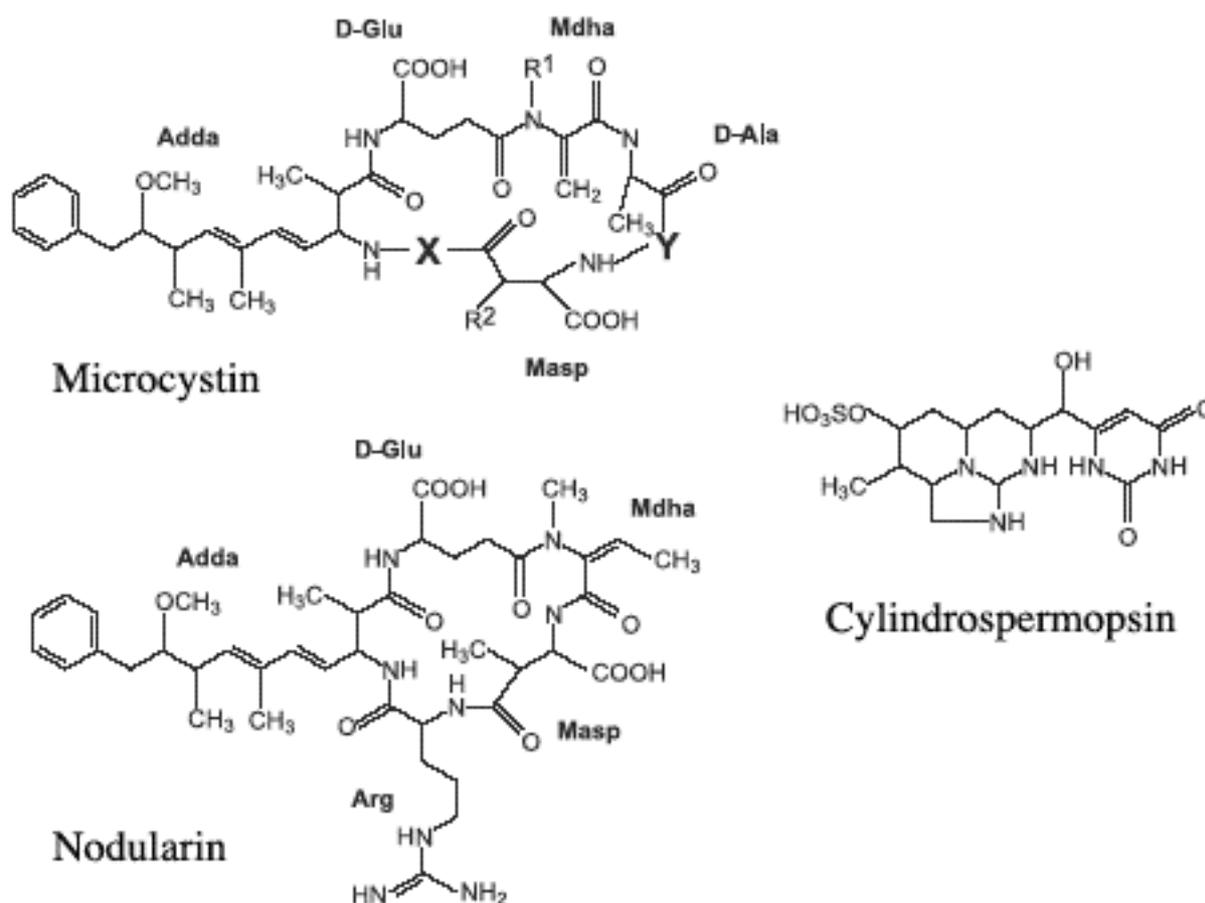


Abb 3. Hepatotoxine (Strukturformeln).

Microcystine und Nodularine sind von Blaualgen produzierte zyklische Heptapeptide mit cancerogener Aktivität durch Inhibierung der Proteinphosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A) (FALCONER, 1999; FUDJIKI & SUGNUMA, 1999). Microcystine und Nodularine sind weit verbreitete Hepatotoxine. Sie werden bei „Wasserblüten“ in Süßwasser- und Meeresbecken gefunden. Die Produktion von Microcystinen wird von Vertretern der Gattungen *Microcystis*, *Anabaena*, *Planctothrix*, *Nostoc* beschrieben, während Nodularin einzig in der Gattung *Nodularia* gefunden wurde. Bis jetzt wurden 60 Strukturformen von Microcystin beschrieben. Diese zyklischen Peptide sind kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 800 – 1000 Da. Die meisten Microcystine sind hydrophil, und insgesamt sind sie nicht in der Lage, die Zellmembran von

Wirbeltieren zu durchdringen, weshalb sie einen ATF-abhängigen Transporteur benötigen, um in die Zelle einzudringen. Im Ergebnis ist die toxische Wirkung von Microcystine und Nodularin begrenzt auf Organe, die einen nichtidentifizierten organischen Anionentransporteur auf ihren Zellmembranen zeigen, wie zum Beispiel die Leber. Das ist eine der Ursachen, weshalb diese Cyanotoxine bei Intoxikationen hauptsächlich die Leber schädigen.

Cylindrospermopsin ist ein in tropischen und subtropischen Wasserbecken von Australien entdecktes Cyanotoxin, das sich strukturell von den anderen Hepatotoxinen unterscheidet (HAWKINS et al., 1985). Dieses Alkaloid (Abb. 3) ist ein Cyto- und Hepatotoxin, das hauptsächlich von *Cylindrospermopsis raciborskii* produziert wird, jedoch auch von *Aphanizomenon ovalisporum* und *Umezakia natans*. Beobachtet wurde eine starke toxische Wirkung bei weißen Mäusen nach intraperitonealer Injektion von Cylindrospermopsin mit einer mittleren Letaldosis (LD₅₀) von 2 µg/kg nach 24 Stunden. Die am häufigsten festgestellte Wirkung dieses Cyanotoxins ist Hepatotoxizität, es schädigt jedoch auch Nieren, Herz und Thymusdrüse der Versuchstiere. Versuche mit Cylindrospermopsin *in vitro* zeigen, dass dieses Cyanotoxin einen stärkeren toxischen Effekt auf primäre Hepatozyten von Ratten im Vergleich zu anderen Zellarten hat.

2.2.3. Dermatotoxine

Zu dieser Cyanotoxingruppe gehören Lyngbyatoxin und Aplysiatoxin (Abb. 4).

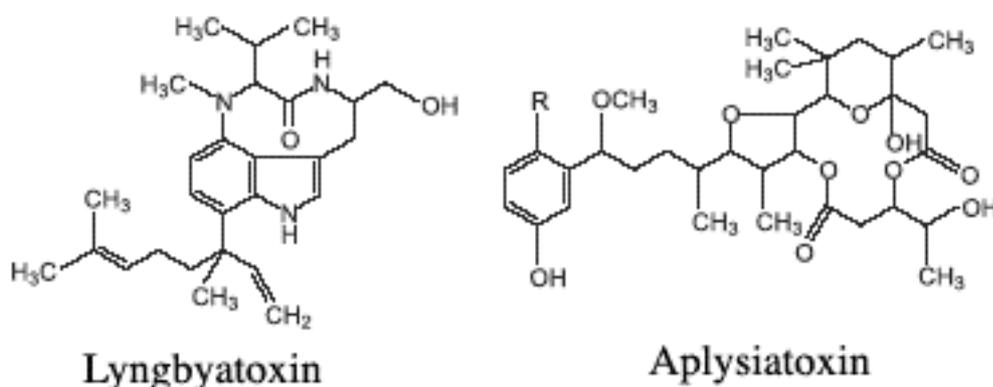


Abb 4. Dermatotoxine (Strukturformeln).

Sie wurden oft nach „Wasserblüte“ durch Salzwasserarten von Cyanoprokaryota gefunden. Beschrieben werden Dermatotoxine als cancerogen und Aktivatoren der Proteinkinase C. Diese Toxine können bei Hautkontakt akute Dermatosen hervorrufen, bei Oralkontakt auch gastrointestinale Entzündungen (MOORE et al., 1993). Bis jetzt wurde als Produzent von Lyngbyatoxin A und Aplysiatoxin die Salzwasserart *Lyngbya majuscula* erwähnt (CARDELINA et al., 1979; OSBORNE et al., 2001), als Produzent von Aplysiatoxin *Schizothrix calcicola* (SIVONEN, 1996).

2.2.4. LPS – Lipopolysaccharide (Endotoxine)

Cyanoprokaryota bilden Lipopolysaccharide als wichtigen Bestandteil ihrer Zellwand. Die cyanobakteriellen LPS unterscheiden sich von den meisten bakteriellen LPS durch das Fehlen von Phosphat im Kern des Lipids A (KELETI & SYKORA, 1982). Bei Tierversuchen erwies sich das cyanobakterielle LPS im Vergleich zum enterobakteriellen als 10-fach schwächer toxisch (CODD, 1984). Die Ergebnisse über das Auftreten von Endotoxinwirkung bei der Injektion von Mäusen sind widersprüchlich. Bei einigen Untersuchungen wurde keine Wirkung beobachtet (WEISE et al., 1970; KELETI et al., 1979), während andere letale Wirkung zeigten, einschließlich einer positiven Schwarzmannreaktion (KELETI & SYKORA, 1982).

3. Blaualgen als Quelle von biologisch aktiven Substanzen

Cyanoprokaryota sind eine reiche Quelle von biologisch aktiven Peptiden, Makroliden, Alkaloiden, Schwefelverbindungen, Cytotoxinen, Fungiziden und einer Reihe von Enzyminhibitoren (OKINO et al., 1992; FUJIKI et al., 1993). Bekanntgemacht wurde ein breites Spektrum biologisch aktiver cyanobakterieller Peptide, einschließlich solcher mit zelldifferentieller Wirkung (Microcystilid A), fungizider Aktivität (Laxophyzin A und B) und immunosuppressive Lipopeptide (Microcolin A und B). Die Blaualgen erzeugen eine Reihe von Serinproteaseninhibitoren, wie zum Beispiel Trypsin, Plasmin, Elastase und Chymotrypsin. OSTENSVIK et al. (1998) berichten über *Aphanizomenon flos-aquae* als Produzent von Stoffen mit antibakterieller und mutagener Aktivität auf ein *Salmonella typhimurium* – Testsystem. Polysaccharide, Sulfolipide und andere aus Blaualgen isolierte Stoffe besitzen antivirale Aktivität, einschließlich Anti-HIV-Aktivität *in vitro* (SHAEFFER et al., 1999; AYEHUDIE et al., 1998), und von *Aphanizomenon flos-aquae* wird auch die Produktion von Galaktolipiden mit antikanzerogener Wirkung mitgeteilt (SHIRABASHI et al., 1996). Andere durch antikanzerogene Wirksamkeit charakterisierte Stoffe sind die aus *Nostoc sp.* isolierten Kryptophyzine (EGGEN & GEORG, 2002).

4. Nachweis der Cyanotoxine

Die Nachweismethoden der Cyanotoxine unterteilen sich in biologische, physikochemische und immunologische (Tabelle 1). Nach einer anderen Klassifizierung werden sie in biologische, physikochemische und biochemische unterteilt, wobei zu den biochemischen die immunologischen gehören. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Nachweismethoden für Cyanotoxine.

Tabelle 1. Wichtigste Methoden des Cyanotoxinnachweises.

Cyanotoxine	Biologische Methoden		Physikochemische (Apparate-) Methoden	Immunologische Methoden
Microcystine	in vivo Tests mit: - Mäusen - Artemia - Daphnia	in vitro Tests mit Zellkulturen	HPLC - UV HPLC - PDA LC/MS MALDI-TOF	ELISA Protein-Phosphatasen Inhibierung
Anatoxin-a		in vitro Tests mit Zellkulturen	HPLC LC/MS GC-ECD GC/MS	
Anatoxin-a(s)	in vivo Tests mit Mäusen		HPLC LC/MS	Enzymatische Methoden
Saxitoxine	in vivo Tests mit Mäusen	Rezeptorische Untersuchungen	HPLC - FL LC/MS	ELISA
Cylindrospermopsin			HPLC - UV LC/MS	
Lyngbyatoxin Aplysiatoxin	in vivo Tests mit Mäusen und histopathologische Analyse			
Endotoxine (LPS)	LAL (Limulus Amebocyte Lysate) Test, in vitro Tests mit Zellkulturen			

4.1. Biologische Methoden

Diese Analysemethoden für Cyanotoxine bieten die Möglichkeit der Feststellung ihres toxischen Potentials *in vivo* und *in vitro*.

In vivo – Untersuchungen bei Mäusen sind gewöhnlich der erste Test für die Toxizität von Wasserproben, Laborkulturen oder Zellextrakten von Cyanoprokaryota. Den Versuchstieren wird meist intraperitoneal Cyanobakterienextrakt oder gereinigtes Cyanotoxin injiziert. Danach wird das Verhalten der Versuchstiere beobachtet, um eventuelle Vergiftungserscheinungen festzustellen. Die Zeit bis zum Todeseintritt und die Dosis werden festgehalten. Auf diese Art wird auch die LD₅₀ des jeweiligen Cyanotoxins bestimmt. Oft wird auch der Gewichtsunterschied der mit dem jeweiligen Cyanotoxin behandelten Mäuse im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Versuchstieren bestimmt, denen zum Beispiel PBS injiziert wurde. Nach Abschluss des Versuchs können Leber, Nieren, Magen und andere Organe für eine histopathologische Analyse isoliert werden, um eventuelle toxische Effekte zu bestätigen oder festzustellen (ITO et al., 2002). Zum Beispiel rufen Hepatotoxine in den Regel eine Lebervergrößerung und Blutfüllung des Organs hervor. Die in Leberproben von behandelten Tieren beobachteten histopathologischen Effekte beim Vorhandensein von Hepatotoxinen sind Erhöhung der Anzahl sich teilender Hepatozyten (Mitosen), Blutfüllung der Sinusoide, Entzündungserscheinungen und Gewebedegeneration. Oft wird aus der Leber behandelter Tiere DNS isoliert, um eine eventuelle Fragmentation der DNS oder als Effekt der Einwirkung eingetretene Mutationen festzustellen (SHEN et al., 2002). Ein

Nachteil dieser Methode ist zum Ersten die Verwendung von Versuchstieren und zum Zweiten die Unmöglichkeit, damit niedrige Cyanotoxinkonzentrationen in den Proben festzustellen (RAO et al., 1996).

In vitro – Methoden zur Untersuchung des toxischen Potentials und der Giftwirkungsmechaismen der von *Cyanoprokaryota* produzierten Cyanotoxine und anderen biologisch aktiven Stoffe wurden entwickelt, um die Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden (Tabelle 2).

Tabelle 2. *In vitro Methoden zur Untersuchung der Cyanotoxinwirkung.*

Cyanotoxine	Zellkulturen
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Microcystine</i> • <i>LPS</i> 	Grabow et al., 1982. Appl. Environ. Microbiol., 43(6): 1425-1433. - human hepatoma cell lines PLC/ PRF/5 - chinese hamster ovary cell line CHO-K1 - human cervical carcinoma cell line HeLa
<i>Microcystin-LR</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Khan et al., 1995. Natural Toxins 3: 119-128. - Primäre Hepatozyten der Ratte - rat skin fibroblasts (ATCC 1213) - rat kidney epithelial cells (ATCC 1571) • Wickstrom et al., 1995. Toxicol Pathol 23: 326-337. - hepatocyte und nonhepatocyte cell lines (rat rental epithelial cells, fibroblasts) • Henning et al., 1992. J Vet Med B, 39: 307-310. - chang liver cells
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Microcystin</i> • <i>Nodularin</i> 	Matsushima et al., 1990. Biochemical and Biophysical Research Communications. 171(2): 867-874. - mouse skin and fibroblasts
<i>Cyanoprokaryotaextrakt</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Heinze et al., . In: Cyanotoxin Occurrence in Freshwaters Chorus, I., (Ed.) 2001, Capitel 8: 317-324. - chinese hamster ovary cell line CHO-K1 - VERO cell line - L 929 cell line • Teneva et al., 2003. Environ. Toxicol., 18(1): 9-20. - RTL-W1 (Zelllinie aus der Leber eines Fisches, <i>Oncorhynchus mykiss</i>) - Zelllinien von Säugetieren
<i>PSP Toxine (Saxitoxine)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Kogure et al., 1988. Toxicon 26: 191-197. - N2A Neuroblastomen-Zelllinie • Jellett et al., 1992. Toxicon 30: 1143-1156. - N2A Neuroblastomen-Zelllinie • Gallacher & Birkirk, 1992. FEMS Microbiol. Lett. 92: 1289-1291. - N2A Neuroblastomen-Zelllinie
<i>Primärkulturen</i>	
<i>Microcystine</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aune & Berg. 1986. Journal Toxicol Environ Health, 19: 325-336. • Aune et al., 1991. Journal Toxicol Environ Health 34: 1-9. - Hepatozyten der Ratte • Mankiewich et al., 2001. Environ Toxicol, 16: 225-233. - Hepatozyten der Ratte - menschliche Lymphozyten
<i>Microcystin- LR</i>	Li et al., 2001. Environ Toxicol, 16: 517-522 - Hepatozyten des Karpfens

Die *in vitro* – Untersuchungen unterteilen sich in **funktionelle** und **immunbiologische**. In beiden Fällen basiert der Cyanotoxinnachweis auf der Einwirkung auf ein „Erkennungselement“. Bei den funktionellen Methoden ist das Erkennungselement ein pharmakologischer Rezeptor, der das erste „Ziel“ der toxischen Substanzen bei den Untersuchungen mit Tieren ist. Bei den immunbiologischen Methoden ist das Erkennungselement die von den Tieren als immunologischen Schutz gegen das Cyanotoxin produzierten Antikörper.

Zum Nachweis der verschiedenen Cyanotoxine wurden drei Gruppen von funktionellen Methoden ausgearbeitet: enzymatische, rezeptorische und Zellmethoden.

Enzymatische Untersuchungen basieren auf der Inhibition der Synthese eines bestimmten Stoffes und werden für Hepatotoxine und Anatoxin-a verwendet.

Rezeptorische Untersuchungen basieren auf der konkurrierenden Inhibition von Radioligandenbindungen unter gleichen Bedingungen. Diese Untersuchungsmethode wird für PSP-Toxine, darunter Saxitoxine, angewendet.

Zelluntersuchungen bestimmen morphologische Veränderungen der Zellen, Cytotoxizität oder Genaktivierung.

Sie basieren grundsätzlich auf einer Zellreaktion, die sowohl Bindung an einen Rezeptor, als auch intrazelluläre Signalisierung umfaßt.

Die Tests auf Cytotoxizität sind ein Teil der Gruppe der Zellmethoden wodurch die Fähigkeit toxisch wirkender Substanzen, Zellen zu töten, keine toxische Wirkung auszuüben oder sogar ihre Entwicklung zu stimulieren, untersucht wird. Dafür werden verschiedene Farbstoffe verwendet, wie zum Beispiel Alamar Blue, MTT, CFDA-AM, Neutral Red. Diese Farbstoffe unterstützen die Feststellung der Einwirkung von toxischen Substanzen auf die Mitochondrien, und genauer die Elektronentransportkette (Alamar Blue, MTT), die Zellmembran (CFDA-AM), wie auch auf die Lysosomen (Neutral Red).

Die Verwendung von Neutral Red und den Fluoreszenzfarbstoffen Alamar Blue und CFDA-AM bei *in vitro* Untersuchungen mit Zelllinien von Fischen wurde von SCHIRMER et al. (1998) ausgearbeitet. Zelllinien von Fischen haben eine Reihe von Vorteilen gegenüber den Zelllinien von Säugetieren bei *in vitro* Untersuchungen der Cyanotoxine (besonders beim Studium von Temperatureinflüssen auf ihren cytotoxischen Effekt), da Fischzellen in einem weiteren Temperaturbereich kultiviert werden können (TENEVA et al., 2003).

Alamar Blue: Das Wirkungsprinzip dieses Stoffes betrifft besonders die mitochondriale Elektronentransportkette. Der Farbstoff tritt in die mit der experimentellen Testsubstanz behandelten Zellen ein. In Abhängigkeit von dem Grade, bis zu dem die schädlichen Substanzen die Mitochondrien nicht geschädigt haben, verwandelt sich Alamar Blue durch Reduktion in einen fluoreszierenden Stoff. Die Fluoreszenz wird bei einer Extinktions/Emissionswellenlänge von 530/595 nm gemessen.

CFDA-AM: Das Wirkungsprinzip dieses Stoffes betrifft besonders das Enzym Elastase und die Zellmembran. Der Stoff dringt schnell in die Zellen ein, im

Endeffekt verwandelt sich CFDA-AM von unspezifischen Esterasen in einen polar fluoreszierenden Stoff (Carboxyfluoreszein) in Abhängigkeit vom Stadium der Unversehrtheit der Zelle. Wenn die Zellmembran intakt ist, kann der Farbstoff erneut langsam ausgeschieden werden. Die Messung erfolgt bei einer Extinktions/Emissionswellenlänge von 493nm/541nm.

Neutral Red ist ein schwach kationischer, wasserlöslicher Supravitalfarbstoff. Er diffundiert durch die Plasmamembran und konzentriert sich in den Lysosomen, wo er sich durch elektrostatische hydrophobe Verbindungen mit den Anionenabschnitten der Lysosomenmatrix verbindet. Das Wirkungsprinzip dieses Stoffes beruht auf seiner Akkumulation in den Lysosomen. In intakten Zellen wird dieser Stoff von den Lysosomen gebunden. Ist die Zelle geschädigt, bleibt NR nicht in den Lysosomen und verläßt die Zelle. Der überschüssige oder nicht gebundene Farbstoff wird in einem Arbeitsschritt durch Auswaschen entfernt. Die Messung erfolgt bei einer Extinktions/Emissionswellenlänge von 530nm/595nm. Zellvitalität, Zelltod, funktionelle Zellaktivität, Dynamik des Plasmalemmas und Unversehrtheit der Lysosomenmembranen stehen in direkter Verbindung mit der in den Zellen angereicherten Farbstoffmenge. Das ist die Grundlage der empfindlichen zytotoxischen Tests zur Beurteilung des Zustands der Zelle.

MTT-Test: MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid] ist ein lösliches Tetrazoliumsalz das eine gelb gefärbte Lösung bildet. Das gelöste MTT verwandelt sich beim Zerreißen des Formasanringes durch Dehydrogenasen-Enzyme in unlösliches purpurnes Formasan. Die aktiven mitochondrialen Dehydrogenasen der lebenden Zellen führen diese Umwandlung durch. In toten oder fixierten Zellen kann die Umwandlung nicht stattfinden.

Durch die Tests für Cytotoxizität bei Benutzung von Zelllinien von Säugetieren und Fischen kann das toxische Potential von Wasserproben, Cyanoprokaryotaextrakten, Cyanotoxinen oder von Cyanoprokaryota produzierten biologisch aktiven Stoffen untersucht werden. Cytotests werden oft mit Licht - oder Elektronenmikroskopie kombiniert, wobei Änderungen der Morphologie und Organisation der Zelle als Ergebnis der Einwirkung bestimmt werden. Auf diese Weise wurde zum Beispiel festgestellt, dass Microcystine die Microfilamentstruktur der Zelle zerstören. PSP-Toxine (Saxitoxine) blockieren, wie bereits erwähnt, die Nervenkanäle und verhindern so den freien Durchgang von Na^+ . Das Prinzip ihrer toxischen Wirkung ist die Grundlage einer Reihe von Untersuchungen auf Cytotoxizität. KOGURE et al. (1988) berichten über die Untersuchung der Cytotoxizität von PSP-Toxinen auf eine N2A Neuroblastomen-Zelllinie von Mäusen, die auf der Fähigkeit von PSP-Toxinen beruht, das Zellwachstum zu beeinflussen sowie ihre Lysierung als Reaktion auf das Eindringen von Na^+ in die Zelle durch Einwirkung mit Veratridin (Na^+ -Kanal-Aktivator) und Oubain (Inhibitor der Na^+/K^+ -Pumpe). zu verursachen. Diese Untersuchung wurde durch JELLET et al. (1992), GALLACHER et al. (1992) und MANGER et al. (1993) zum automatischen Ablesen modifiziert und basiert auf der Akkumulation des Farbstoffs Kristallviolett (JELLET et al., 1992) und Neutralrot (GALLACHER & BIRKBECK, 1992) oder der Umwandlung des gelben Mitochondrien-Farbstoffs MTT in blaue Formasankristalle (MANGER et

al., 1993). Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels Spektrophotometer. Tabelle 2 zeigt einige Beispiele für *in vitro* Untersuchungen von Cyanotoxinen unter Benutzung von Zelllinien und primären Zellkulturen. Die Tests auf Cytotoxizität können mit *in vivo* Untersuchungen von Mäusen und immunbiologischen Methoden (ELISA) kombiniert werden.

4.2. Biochemische Methoden. Immunologische Methoden

Die biochemischen Nachweismethoden für Cyanotoxine ersetzen die biologischen als schnelle Screeningprozeduren mit dem Vorteil, dass sie viel empfindlicher sind (ppb – ppt). Zu dieser Gruppe von Methoden gehören die immunologischen (ELISA) und die enzymatischen Untersuchungen (Inhibierung der Proteinphosphatasen und Azetylcholinesterasen). Die biochemischen Methoden sind im Vergleich zu den physikochemischen viel empfindlicher und schneller, weshalb sie zum Screening von Natur- und Wasserproben gut geeignet sind.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Grundlage dieser Tests ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Sie wurden für kommerzielle Zwecke ausgearbeitet (als monoklonale und polyklonale ELISA-Kits) und zum Nachweis von Microcystinen, Nodularinen und PSP-Toxinen angepasst und werden in den letzten Jahren erfolgreich angewendet.

ELISA-Test auf Microcystine/Nodularin. Die erste Mitteilung über festgestellte polyklonale Antikörper gegen Microcystin-LR bei Kaninchen stammt von CHU et al. (1989). Die erste erfolgreiche Isolierung von monoklonalen Antikörpern von Microcystin-LR wird von NAGATA et al. (1995, 1997) mitgeteilt, und die erste erfolgreiche Anwendung von antimikrozystin-monoklonalen Antikörpern wurde von KFIR et al. (1986) mitgeteilt. Die beiden Typen von Antikörpern zeigen eine gute Kreuzreaktion mit den meisten Microcystinen und Nodularinen (AN & CARMICHAEL, 1994). Eine diese Antikörper nutzende ELISA-Methode zum Nachweis von Microcystinen und Nodularinen in Wasserproben wurde von CHU et al. (1990) vorgeschlagen. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt in der Größenordnung von 0,05 ppb bis 0,5 ppb. Anti-Microcystin-Antikörper wurden erfolgreich zur Untersuchung von Trinkwasser verwendet (UENO et al., 1996; CARMICHAEL et al., 1998). Modifikationen und Ergänzungen der bereits ausgearbeiteten Methoden zum immunologischen Nachweis von Microcystinen sowie zur Reinigung des Toxins werden von NAGATA et al. (1999) und KONDO et al. (2000) mitgeteilt.

Direkter konkurrierender ELISA-Test unter Benutzung von polyklonalen Antikörpern. Bei dieser Untersuchung ist der anti-Microcystin-Antikörper mit der festen Phase verbunden (gewöhnlich eine Mikrotiterplatte mit hochbindender Fähigkeit), und als Standard wird Microcystin-LR verwendet. Microcystin-LR-Peroxydase konkurriert mit Microcystin-LR um die Verbindungsabschnitte der Antikörper, die ihrerseits an die Platte gebunden sind. Der Farbwechsel ist der

Microcystinkonzentration umgekehrt proportional, d.h. eine dunklere Farbe beweist eine niedrige Microcystinkonzentration, eine hellere Farbe eine höhere.

Indirekter konkurrierender ELISA-Test unter Benutzung von monoklonalen Antikörpern. Bei dieser Methode ist Microcystin-LR-Albumin aus Kalbsserum (MC-LR-BSA) an die Mikrotiterplatte gebunden. Microcystin-LR wird als Standard benutzt. Monoklonale Antikörper von Microcystin-LR (primärer Antikörper) konkurrieren mit dem Microcystinen in den Proben um die Bindung an die mit MC-LR-BSA beschichtete Platte. Zum Nachweis werden HRP-(horseradish peroxidase) markierte anti-Mäuse IgG Antikörper benutzt. Der Farbwechsel ist der Microcystinkonzentration umgekehrt proportional, d.h. eine dunklere Farbe beweist eine niedrige Microcystinkonzentration, eine hellere Farbe eine höhere.

ELISA-Test auf Saxitoxine. Es wurden eine Reihe von ELISA-Methoden zum Nachweis von PSP-Toxinen unter Benutzung von polyklonalen Antikörpern mitgeteilt (CHU et al.,1985; DAVIO et al., 1984; CEMBELLA et al., 1990; USLEBER et al.,1991). Auf der Basis der letzteren beiden Methoden wurden kommerzielle Tests zum Saxitoxinnachweis entwickelt: Saxitoxin TestTM (Institut Armand-Frapier, Quebec, Canada) und RidascreenTM Test Kit (R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

Prinzipien beim Testen mit RidascreenTM Test Kit. Der Boden der Mikrotiterplatte ist bei diesem Kit mit einer Schicht von Antikörpern gegen Saxitoxine bedeckt. Standards, die Probe und enzymmarkierte Saxitoxine werden zugesetzt. Das freie und das enzymmarkierte Saxitoxine konkurrieren um die Verbindungsstellen der Antikörper. Das ungebundene enzymmarkierte Saxitoxine werden bei einem Arbeitsgang ausgewaschen. Der Beweis für die Anwesenheit dieses Cyanotoxins in den Proben wird durch Zugabe von Substrat und Chromogen geführt. Das gebundene Enzymkonjugat verwandelt das farblose Chromogen in ein farbiges Endprodukt. Die photometrische Messung wird bei 450 nm durchgeführt. Die Extinktion der Lösung ist der Toxinkonzentration in der Probe umgekehrt proportional.

Enzymuntersuchungen

PPIA-(Protein Phosphatase Inhibition Assay) Methode.

Es wurde festgestellt, dass die Microcystine und Nodularine zu den stärksten natürlichen Inhibitoren der Protein Serin/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A gehören (YOSHIZAWA et al., 1990; HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990). Mitgeteilt wird, dass die chemische Struktur der Microcystine und Nodularine, ihre Natur als zyklische Peptide und β -Aminosäuren (kurz Adda) im Wesentlichen ihre inhibitorische Aktivität gegen PP1 und PP2A bestimmt (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990). Die Proteinphosphatasen können p-Nitrophenylphosphat (pNPP) dephosphorilieren, wobei sie gewöhnlich als Substrat alkalische

Phosphatasen benutzen. Auf dieser Grundlage erarbeiteten TAKAI & MIESKES (1991) eine Methode zur Untersuchung des Inhibitionseffekts der Okadainsäure, einer aus Dinoflagellaten isolierten Polyether-Fettsäure, auf PP1, PP2A und PP2C. SIMON & VERNOUX (1994) benutzen diese kolorimetrische PPIA-Methode zur quantitativen Bestimmung der Okadainsäure in Extrakten von Muscheln und Wasserproben. AN & CARMICHAEL (1994) adaptieren diese Methode unter Benutzung der katalytischen Untereinheit von PP1 zur inhibitorischen Untersuchung von Microcystinen und Nodularinen. Fünf Formen Microcystin und zwei Formen Nodularin wurden auf den inhibitorischen Effekt auf PP1 bei Nutzung von pNPP als Substrat getestet. Die festgestellte lineare Abhängigkeit der Inhibition von PP1 bei verschiedenen Konzentrationen von Microcystin-LR in den getesteten Lösungen liegt zwischen 1 und 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Diese Untersuchung zeigt, dass die Nachweisgrenzen bei der Inhibition von PP1 den Nachweisgrenzen von Microcystinen und Nodularinen bei den ELISA-Tests entsprechen. Der große Vorteil der PPIA-Methoden gegenüber von ELISA ist, dass durch PPIA der Nachweis der Bioaktivität von Microcystin-LR und Nodularin möglich ist. Der Nachweis von Microcystinen und Nodularinen auf der Basis ihrer funktionellen Aktivität ist also dem Nachweis von Strukturkomponenten vorzuziehen. Außerdem ist bei dieser Nachweismethode die Toxizität der untersuchten Cyanotoxine ihrer inhibitorischen Aktivität gegen Proteinphosphatasen direkt proportional. Andere Autoren berichten ebenfalls über die erfolgreiche Anwendung des PPIA-Nachweises sowohl unter Benutzung von kolorimetrischen Methoden (RIVASSEAU et al., 1999; WONG et al., 1999), als auch von radioaktiven Substraten (HOLMES, 1991; SERRES et al., 2000).

Sowohl die kolorimetrische PPIA-Methode (AN & CARMICHAEL, 1994), als auch die - radioaktive P^{32} -Methode (LAMBERT et al., 1994) wurden erfolgreich für den Nachweis und die quantitative Bestimmung von Microcystinen und Nodularinen in Naturproben adaptiert. Das Hauptproblem bei dieser Nachweismethode ist die Möglichkeit von falschen Positiven durch andere Proteinphosphatasen. In diesem Zusammenhang ist ein Arbeitsschritt wie zum Beispiel die Methanolextraktion der Naturprobe vorzuziehen.

Das Prinzip des PPIA-Tests. Die Microcystine und Nodularine verbinden sich unlöslich und ohne Konkurrenz kovalent mit der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase (PP1 und PP2A). Je größer die Menge der Microcystine und Nodularine in der Probe ist, desto mehr PP1 und PP2A werden inhibiert. Die Proteinphosphatasen dephosphorilieren pNPP und produzieren Paranitrophenol, ein gelb gefärbter Stoff. Die Proteinphosphataseaktivität gegenüber pNPP wird durch Messung der Intensität bei 405 nm bestimmt. Eine dunklere Farbe bedeutet niedrigere Konzentration des Cyanotoxins oder mehr gebildetes Nitrophenol (höhere PP-Aktivität). Eine hellere Farbe bedeutet höhere Konzentration des Toxins oder weniger gebildetes Nitrophenol (schwächere PP-Aktivität).

Rezeptorische Untersuchungen

Viele Toxine zeigen ihre biologische Aktivität auf Zellebene mittels Bindung an Rezeptoren. Die PSP-Toxine binden sich zum Beispiel an Rezeptoren in der Nachbarschaft von Na⁺-Kanälen. Die rezeptorische Nachweismethode von Cyanotoxinen wurde ursprünglich zum Zweck der Charakteristik des Zusammenwirkens verschiedener Liganden (einschließlich einer Reihe von die Ionenkanäle beeinflussenden Neurotoxinen) mit Membranrezeptoren ausgearbeitet. Diese Methode macht eine quantitative Beurteilung des gesamten toxischen Potentials von einer Gruppe von Cyanotoxinen enthaltenden Proben möglich, denn sie alle binden sich an einen und denselben Rezeptor, und die relative Affinität der Bindung korreliert mit ihrem relativen toxischen Potential. Die Nachweisgrenze liegt im Rahmen von pmol, denn die Bindungsfähigkeit der Cyanotoxinen an diese Rezeptoren liegt in den Grenzen von nM. Als Nachteil dieser Methode kann angesehen werden, dass sie sehr arbeitsaufwendig und langsam ist. Die Modifikation der traditionellen Protokolle der Nutzung von Mikrotiterplatten kann die Analysezeit um 3 Stunden reduzieren (VAN DOLAH et al., 1994). Die Verwendung von radioaktiv markierten Cyanotoxin-Analogen begrenzt die Möglichkeiten der Methode auf das jeweilige Laboratorium. Modifizierungen der Methode in Richtung kolorimetrische oder fluorometrische Markierung reduzieren die Bindungsneigung des Cyanotoxin - Analogs an den Rezeptor bedeutend.

Diese Nachweismethode basiert auf der konkurrierenden Bindung des Cyanotoxin-Standards oder der ein Toxin-Analog enthaltenden Probe an einen bekannten Cyanotoxinrezeptor. Die gebundenen oder nicht gebundenen Toxine werden durch Zentrifugieren oder Filtrieren getrennt und die im Gemisch gebildete Menge radioaktiver Komplex wird durch Messung der Szintillation nachgewiesen. Die Bestimmung der Toxinmenge in den Proben geschieht nach einer Standardkurve, die auf der Basis eingetragener Konzentrationsgrade des nicht markierten Toxins in Bezug auf den Komplex Rezeptor - markiertes Cyanotoxin-Analog aufgestellt wurde.

4.3. Physikochemische (Apparate-) Methoden

Physikochemische (Apparate-) Nachweismethoden von Cyanotoxinen sind HPLC, GC-ECD, MALDI, LC-MC u.a. (CODD et al., 1994): Die meisten analytischen Untersuchungen von Cyanotoxinen betreffen Microcystine und Nodularine (CODD et al., 1994; BELL & CODD, 1996, HARADA et al., 1999). MERILUOTO (1997) fasst die chromatographischen Analysemethoden für Microcystine und die Maßnahmen für Extraktion und Reinigung der Proben zusammen. Die Analysemethoden für Microcystine sind insgesamt auch auf Nodularine anwendbar. Anfang der achtziger Jahre machte die Chromatographie einen Fortschritt, als alle chromatographischen Methoden sowohl für die Zwecke, als auch für vorbereitende Maßnahmen (wie Reinigen und Separieren) und zur Analyse adaptiert wurden und anwendbar sind.

Die am häufigsten angewandte Apparate-Analysemethode zum Nachweis von Microcystinen und Nodularinen ist HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Tabelle 3). Die Cyanotoxine werden voneinander und den übrigen zusammen mit ihnen ausgezogenen Komponenten durch Benutzung verschiedener Säulen (C₁₈, C₁₆, Ionenaustauscher usw.) und eine Methanol oder Azetonitril enthaltende mobile Phase getrennt (KRISHNAMURTY et al., 1986; HARADA et al., 1988a,b; LAWTON et al., 1994).

Tabelle 3. HPLC – Methoden zum Zyanotoxinnachweis

Cyanotoxin	Literatur zur Methode
<i>Microcystine</i>	Lawton et al., 1994. Analyst 119: 1525-1530.
<i>PSP (Saxitoxine)</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sullivan J. et al., 1987. Proceedings of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska, Anchorage, USA, p. 357. • Lawrence & Menard, 1991. J Assoc Off Anal Chem., 74, p. 1006. • Thielert G. 1993. Ph D Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany • Oshima et al., 1993. In: Smayda Tj, Shimizu Y (eds), Toxic Phytoplankton in the Sea. Elsevier B.V. Amsterdam: p. 9. • Oshima Y. 1995. J Assoc Off Anal Chem., 8, p. 2. • Yu et al., 1998. Chromatographia 48: 671-676.
<i>Anatoxin-a</i> <i>Homoanatoxin</i>	James & Sherlock, 1996. Biomed Chromatogr., 10: 46-47.
<i>Cylindrospermopsin</i>	Hawkins et al., 1997. Toxicon 35(3): 341-346.

Sind die Cyanotoxine getrennt, folgt ihre Bestimmung. Der Nachweis ist ein kritischer Punkt, und es sollten spezifische und für das jeweilige Cyanotoxin empfindliche Prozeduren verwendet werden. Koextrahierte Stoffe (meist organische Beimengungen) können den Nachweis der Cyanotoxine maskieren, weshalb zusätzliche Reinigungsmaßnahmen empfohlen werden (TSUJI et al., 1994; HUMMERT et al., 1999). Die Grenzen des Nachweises sind abhängig von der Toxinkonzentration in der Probe und der analysierten Menge, wobei der Nachweis am häufigsten durch Messung der UV-Absorption durchgeführt wird. Die meisten Microcystine und Nodularin haben ein UV-Absorptionsmaximum bei 238 nm (LAWTON et al., 1994, 1995). Die Anwesenheit von Cyanotoxinen in der untersuchten Probe wird durch Vergleich der Verweilzeit (retention time) des Piks in Probe und Standard bestimmt. Diese Werte können nicht zum Nachweis von Cyanotoxinen mit ähnlicher Struktur verwendet werden, da zum Beispiel die verschiedenen Microcystine ähnliche Absorptionsspektren haben, wenn sie bei 238 nm mit HPLC analysiert werden (HARADA et al., 1990, 1991). Der HPLC-Nachweis mit PDA (Photodiode Array) ist wahrscheinlich die beste Kombination zur Bestimmung von verschiedenen Microcystinformen. Dieser Nachweis zeichnet nicht nur die UV-Absorption bei einer Wellenlänge auf, sondern auch das Spektrum der getrennten analysierten Bestandteile. Cylindrospermopsin kann ebenfalls mit HPLC mit einer Wellenlänge von 262 nm nachgewiesen werden (HARADA et al., 1994).

Die Dünnschichtchromatographie ist eine relativ billige und elementare Methode, mit der Microcystine und Anatoxin-a bei Benutzung von C₁₈ und Silikagel isoliert werden können (POON et al., 1987; HARADA et al., 1988). In letzter Zeit wurde diese Methode zur Analyse von Microcystinen und Nodularinen durch OPLC (Overpressured Layer Chromatography) adaptiert. Die Nachweisgrenze von Microcystinen wird durch die Anwendung von UV-Nachweis reduziert (PELANDER et al., 1998).

Flüssigchromatographie (LC, Liquid Chromatography) ist die am häufigsten verwendete Methode zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Microcystinen und Nodularinen unter Benutzung einer C₁₈-Säule mit umgekehrter Phase und UV-Nachweis. MERILUOTO (1997) diskutiert die Möglichkeiten der Anionenaustausch- und Innenoberflächen- Flüssigchromatographie mit umgekehrter Phase, wobei er auch die Neuheiten bei Analyse und Reinigung von Microcystin aus Naturproben beschreibt. Die Anzahl von beschriebenen Microcystinformen, die hinsichtlich der Struktur und Zusammensetzung aller 7 Positionen im zyklischen Heptapeptid variieren, ist nach neuesten Angaben 67. Hinsichtlich der zahlreichen und häufig auftretenden Microcystinformen und der Variationen ihres UV-Absorptionsspektrums ist der Photodiodennachweis (PDA) dem Nachweis bei einer Wellenlänge vorzuziehen. Die LC-PDA-Methode sowie die Vorbereitung der Proben und ihre Extraktion zur Analyse von intra- und extrazellulären Microcystinen und Nodularinen war Objekt einer Interlaboratoriums-Standardisierung der Britischen Analysekommission. Diese Methode wird in Großbritannien bei der Analyse von Labor- und Naturproben erfolgreich angewendet (BELL & CODD, 1996; LAWTON et al., 1994), und mit kleinen Variationen auch andernorts (HARDING et al., 1995; FASTNER et al., 1999). Vorzuziehen ist die Befolgung der ursprünglichen LC-PDA-Methode (LAWTON et al., 1994) bei Laboratoriumsanalysen mit Modifikationen, falls das erforderlich ist. Die auf der Anziehung der zyklischen Strukturen an eine glatte Kohlenstoffelektrode bei angelegter Spannung basierende elektrochemische LC-Nachweismethode ist zur Analyse von Arginin und Tyrosin enthaltenden Microcystinen geeignet, wie zum Beispiel RR, -LR und -YR, sowie für Nodularine (von denen die meisten Arginin enthalten). Bei Benutzung der Methode zur Analyse von Naturproben sind diese vorher zu reinigen (MERILUOTO et al., 1998). LC- und UV-Nachweis wird erfolgreich bei der Bestimmung von Anatoxin-a angewendet, da dieses Cyanotoxin eine hohe Absorption bei 227 nm hat (EDWARDS et al., 1992; HARADA et al., 1989). LC-PDA wird zum Nachweis von Cylindrospermopsin angewandt, das ein Absorptionsmaximum bei 262 nm hat. Die bei der Analyse von PSP in Meeresproben angewandten Flüssigchromatographie-Methoden sind auch auf von Cyanoprokaryota in Süßwasserbecken produzierte Saxitoxine anwendbar (OSHIMA et al., 1993; OSHIMA, 1995).

Die Massenspektrometrie (MC) bietet als Nachweismethode (nach HPLC-Trennung) eine wesentlich bessere Lösung der strittigen Punkte bei der Bestimmung der Microcystinformen (YUAN et al., 1998, 1999a,b), da die Microcystine in ihren Massenspektren spezifische Ionen bilden.

In den letzten Jahren werden zur Analyse von Cytotoxinen Kombinationen verschiedener physikochemischer Methoden angewandt (LC-MS/MS; LC-TSP-MS; CE-ESI-MS; MMPC-GC/MS; EI-GC/MS u.a.): Erhöhtes Interesse besteht an der MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight) - Nachweismethode, mit der Hepatotoxine erfolgreich bestimmt werden. Die Methode ist jedoch zum Nachweis niedermolekularerer Cyanotoxine (zum Beispiel Anatoxin-a) nicht zu empfehlen.

Als genauester und sicherster Nachweis der von Cyanoprokaryota produzierten Cyanotoxine gilt bis auf Weiteres die Kombination von einigen Arten immunbiologischer Untersuchungen (ELISA) mit der auf der Inhibierung der Proteinphosphatasen beruhenden Untersuchung (AN & CARMICHAEL, 1994; TSUTSUMI et al., 2000a,b).

5. Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit

Die Fälle von Intoxikationen, Laboruntersuchungen über die Toxizität der Cyanotoxine sowie auch Beobachtungen und Schlussfolgerungen aus den Wirkungen dieser Toxine führen zu dem Schluss, dass die Cyanotoxine eine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen, wenn diese Toxine in Trinkwasser oder in Bade- und Erholungsgewässern vorkommen. Die Cyanotoxine können relativ schnell starke Wirkungen haben, wie Gastroenteriten, allergische und krankhafte Reaktionen, Pneumonie-imitierende Symptome und Hepatoenteriten. Manchmal sind Hepatotoxine (Mikrozystine) die Ursache für Langzeitwirkungen (zum Beispiel Leberschädigung oder kanzerogene Effekte) bei andauernder Einwirkung, auch in kleinen Dosen (FALCONER, 1991; CARMICHAEL & FALCONER, 1993; CHORUS et al., 2000). Die von Cyanoprokaryota produzierten Neurotoxine können durch die Nahrungsketten weitergegeben werden und bei Menschen nach dem Konsumieren von mit Cyanotoxinen kontaminierter Nahrung Intoxikationen hervorrufen.

5.1. Mit der Nahrung verbundene Krankheitserscheinungen

Die meisten Mitteilungen von mit Cyanoprokaryota -Toxinen verbundenen Erkrankungen von Menschen sind Fälle von Gastroenteritis, die durch die Anwesenheit von Cyanotoxinen im Trinkwasser oder der Massenerholung dienenden Gewässern verursacht werden. Die Bevölkerung der Küstenregionen von Polen und Schweden zum Beispiel zeigt nach der Konsumierung von Fisch (besonders der Leber) aus Gewässern, in denen Wasserblüte beobachtet wurde, Symptome einer Erkrankung, die später Haff-Krankheit genannt wurde. Die bei den Erkrankten beobachteten Symptome sind braunschwarze Färbung des Urins, Muskelschmerzen und gefährliche bis tödliche Atemhemmungen. TURNER et al. (1990) teilen mit, dass Kontakt mit toxischen *Microcystis*-Arten das Auftreten von Blasen auf den Lippen verursachen kann.

Der Verbrauch von getrockneter *Spirulina* und anderer Cyanoprokaryotaarten ist durch ihre Anpreisung als gesunde Nahrung und Nahrungszusatz weit verbreitet. Die

Aufnahme solcher Tabletten birgt jedoch ein Risiko wegen der Möglichkeit ihrer Kontaminierung mit einigen toxischen Arten oder Stämmen.

5.2. Allergische und krankhafte Reaktionen

Durch Cyanoprokaryota hervorgerufene Allergien sind eine relativ häufige Erscheinung. Ihr Auftreten wurde meistens nach Kontakt von Schwimmern in Süßwasser- oder Meeresbecken im Augenblick von Wasserblüte beschrieben. Eine der ersten Mitteilungen, die Cyanoprokaryota als Verursacher von allergischen Reaktionen beschreiben, nennt als Symptome Asthma, das bei Schwimmern auftrat, die mit einem durch *Oscillatoria* kontaminierten Gewässer in Kontakt gekommen waren.

MITTAL et al. (1979) beschreiben allergische Einwirkungen durch aus Luftproben isolierte Cyanoprokaryota. Eine Reihe von Süßwasser-Cyanoprokaryotaarten (darunter *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria* und *Gleotrichina*) verursachen Kontaktdermatiten mit verschiedenem Grad der Hautschädigung. Die am häufigsten mitgeteilte und am besten dokumentierte, von einer Meeres-Cyanoprokaryotaart verursachte toxische Reaktion ist die sogenannte „swimmer's itch“. Es ist eine starke Hautentzündung, die einer Verbrennung ähnelt, gefolgt von Blasenbildung und Schälung der Haut. Diese Dermatitis ist das Resultat der Einwirkung von zwei Stoffen: DebromoAplysiatoxin und Lyngbyatoxin-A, isoliert aus *Lyngbya majuscula*.

5.3. Lebererkrankungen

Beweise für einen Zusammenhang zwischen Leberschädigungen bei Menschen und Cyanotoxinen wurden von FALCONER (1991) mitgeteilt. Ergebnisse eines Routinetests der Leberfunktion von Patienten eines Krankenhauses in Armidale (Australien) zeigen statistisch signifikant eine saisonal auftretende lokale Aktivitätserhöhung des Leberenzym γ -Glutamyltransferase, die zeitlich immer mit dem Vorkommen der Hepatotoxin produzierenden Cyanoprokaryotaart *Microcystis aeruginosa* im Trinkwasserreservoir zusammenfällt. Der frappanteste Fall von Vergiftung durch Cyanotoxine, die den Tod von Menschen zur Folge hatte, wird aus Brasilien mitgeteilt. Nach TEIXERA et al. (1993) ist eine massive Wasserblüte von *Anabaena* und *Microcystis* in Itaparzia Dam die Ursache von etwa 2000 Gastroenteritisfällen vor allem bei Kindern, davon 88 tödlich. Im Jahre 1996 wurden Leberschädigungen und 60 Todesfälle von Patienten des Dialysezentrums in Karuaru (Brasilien) durch bei der Dialyse verwendetes mit Microcystin kontaminiertes Wasser beobachtet. Die Symptome waren hohe Mengen von Bilirubin, alkalischen Phosphatasen und erhöhte Menge Leberenzyme (JOCHIMSEN et al., 1998; POURIA et al., 1998).

5.4. Kanzerogene Wirkung

Hepatotoxine sind eine potentielle Gefahr für die menschliche Gesundheit wegen ihrer kanzerogenen Wirkung. Sie tritt gewöhnlich nach Hautkontakt beim Baden in offenen Gewässern auf oder nach längerdauernder Einwirkung der Cyanotoxine auf Substratniveau durch das Trinkwasser.

Microcystine und Nodularine sind bekannt als starke Inhibitoren der Proteinphosphatasen 1 und 2A, sowie als tumorverursachende Stoffe mit oder ohne Beteiligung von Initiatoren (MACKINTOSH et al., 1990). Mitgeteilt wird, dass Extrakte aus Cyanoprokaryota oder die Anwesenheit von Microcystin-LR im Trinkwasser bei Ratten und Mäusen nach Initiierung mit 7,12-Dimethylbenzanthrazen Hautkrebs verursacht (FALCONER & HUMPAGE, 1996). Es wurde festgestellt, dass Microcystine und Nodularin den Ausdruck von TNF- α induziert, sowie der an der Primärantwort teilnehmenden Gene (*c-jun*, *jun B*, *jun D*, *c-fos*, *fos-B*, *fra-1*) in Rattenleber und Hepatozyten (SUEOKA et al., 1997). Mutationen des K-ras Kodon 12 in der Rsa Zelllinie (SUZUKI et al., 1998) und DNS-Fragmentation werden nach intraperitonealer Injektion von Cyanoprokaryotaextrakt oder Microcystin-LR bei Mäusen mitgeteilt (RAO & BHATTACHARYA, 1996; RAO et al., 1998). Diese *in vitro* und *in vivo*-Ergebnisse können mit den in China beobachteten sich häufenden Leberkrebsfällen nach Aufnahme von mit Microcystinen verschmutztem Wasser in Verbindung gebracht werden (YU, 1989; UENO et al., 1996).

Die von der Salzwasserart *Lyngbya majuscula* produzierten Lyngbyatoxin A und Aplysiatoxin, die bei Kontakt Hautschäden verursachen, werden auch als tumorbildende Cyanotoxine charakterisiert.

Das durch die sich in den letzten Jahren häufenden toxischen Wasserblüten entstehende ökologische Risiko besonders für Flora, Fauna und Bevölkerung der betroffenen Gebiete ist groß. Das erfordert die Notwendigkeit zukünftiger Untersuchungen hinsichtlich der Verhinderung von Wasserblüten und Wasserreinigung, sowie die Ausarbeitung von genaueren und zuverlässigen Nachweismethoden der Cyanotoxine.

LITERATUR

- AN J., CARMICHAEL W.W. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32: 1495–1507.
- AYEHUNIE S., BELAY A., BABA T.W., RUPRECHT R.M. 1998. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 18(1): 7-12.
- BELL S.G., CODD G.A. 1994. Cyanobacterial toxins and human health. *Rev. Med. Microbiol.*, 51: 256-264.
- BELL S.G., CODD G.A. 1996. Detection, analysis and risk assessment of cyanobacterial toxins. In: *Agricultural Chemicals and the Environment*, R.E. Hester & R.M. Harrman (Eds) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 109-122.

- CARDELLINA J.H., MARNER F.J., MOORE R.E. 1979. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science* 204: 193-195.
- CARMICHAEL W.W. 1988. Toxins of freshwater algae. In: Tu, A.T. (Ed.), *Handbook of Natural Toxins*. Marcel Dekker, New York, pp. 121-147.
- CARMICHAEL W.W. 1994. The toxins of Cyanobacteria. *Scientific American*, January, 64-72.
- CARMICHAEL W.W. 1997. The Cyanotoxins. *Advances in Botanical Research* 27: 211-256.
- CARMICHAEL W.W., BRIGGS D.F., GORHAM P.R. 1975. Toxicology and pharmacological action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 187, 542-544.
- CARMICHAEL W.W., DECKARD M.R., AN J, CHU F.S., HUANG X., KRASNER S., HASAN M. 1998. Assessment of blue-green algae toxins in raw and finished drinking water. *Proceedings 4th International Conference on Toxic Cyanobacteria*, Duke University Marine Laboratory, Morehead City, North Carolina, 27 Sep – 1 Oct, 23 (abstract).
- CARMICHAEL W.W., EVANS W.R., YIN Q.Q., BELL P., MOCZYDLOWSKI E. 1997. Evidence for paralytic shellfish poisons in the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) comb. nov. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(8): 3104-3110.
- CARMICHAEL W.W., FALCONER I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins and control measures. In: *Algal toxins in seafood and drinking water*. (Ed.: I.R. Falconer). Academic press, London, pp. 187-209.
- CARMICHAEL, W.W., MAHMOOD, N.A., HYDE, E.G. 1990. Natural toxins from cyanobacteria. In: Hall, S., Strichartz, G. (Eds.), *Marine toxins, Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, ACS Symposium Series 418. American Chemical Society, Washington DC, pp. 87-106.
- CASTENHOLZ R.W., WATERBURY J.B. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group 1. Cyanobacteria. In: Stanley J.T., Bryant M.P., Pfennig N., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. Baltimore, pp. 1710-1806.
- CEMBELLA A.D., PARENT Y., JONES D., LAMOUREAUX G. 1990. Specificity and cross-reactivity of an absorption-inhibition enzyme-linked immunoassay for the detection of paralytic shellfish toxins. In: *Toxic Marine Phytoplankton*, E. Graneli, B. Sundstrom, L. Edler and D.M. Anderson (Eds) Elsevier Science, New York, NY pp. 339-344.
- CHORUS I., FALCONER I.R., SALAS H.J., BARTRAM J. 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health B*, 3(4): 323-347.
- CHU F.S., FAN T.S. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 68(1): 13-16.
- CHU F.S., HUANG X., WEI R.D. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. *J. Assoc. Analyt. Chem.* 73: 451-456.

- CHU F.S., HUANG X., WEI R.D., CARMICHAEL W.W. 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. *Appl Environ Microbiol.* 55: 1928–1933.
- COOD G.A., BELL S.G. 1996. The occurrence and fate of blue-green algal toxins in freshwaters. National Rivers Authority R & D Report No. 29, Her Majesty's Stationery Office, London, UK, 30 pp.
- COOD G.A. 1984. Toxins of freshwater cyanobacteria. *Microbiological Science*, 1: 48–52.
- COOD G.A., JEFFERIES T.M., KEEVIL C.W., POTTER E., eds. 1994. Detection methods for Cyanobacterial toxins. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 191 pp.
- DAVIO S.R., FONTELO P.A. 1984. A competitive displacement assay to detect saxitoxin and tetrodotoxin. *Anal. Biochem.*, 141(1): 199–204.
- DITTMANN E., NEILAN B.A., ERHARD M., VON DOHREN H., BORNER T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Mol. Microbiol.* 26(4): 779–787.
- EDWARDS C., BEATTIE K.A., SCRIMGEOUR C.M., CODD G.A. 1992. Identification of anatoxin-a in benthic Cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 30: 1165–1175.
- EGGEN M., GEORG G.I. 2002. The cryptophycins: their synthesis and anticancer activity. *Med. Res. Rev.* 22(2): 85–101.
- FALCONER I.R., HUMPAGE A.R. 1996. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, 35: 74–79.
- FALCONER, I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 177–184.
- FASTNER J., NEUMANN U., WIRSING B., WECKESSER J., WIEDNER C., NIXDORF B., CHORUS I. 1999. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environ. Toxicol.* 14: 13–22.
- FRANCIS G. 1878. Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11–12.
- FUJIKI H., SUGNUMA M., 1999. Unique catures of the okadaic acid activity class of tumour promoters. *J. Can. Res. Clin. Oncol.* 6: 177–184.
- FUJIKI H., SUGNUMA M., YATSUNAMI J., KOMORI A., OKABE S., NISHIWAKI-R. MATSUSHIMA, OHTA T. 1993. Significant marine natural products in cancer research. *Gaz. Chim. Ital.*, 123: 309–316.
- GALLACHER S., BIRKBECK TH. 1992. A tissue culture assay for direct detection of sodium channel blocking toxins in bacterial culture supernates. *FEMS Microbiol. Lett.* 71(1): 101–107.
- HARADA K., KIMURA Y., OGAWA K., SUZUKI M., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W. 1989. A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 27(12): 1289–1296.

- HARADA K.I., KONDO F., LAWTON L. 1999. Laboratory analysis of cyanotoxins. In: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management, I. Chorus & J. Bartram (Eds) E & FN Spon, London & New York, pp. 369-405.
- HARADA K.I., MATSURA K., SUZUKI M., WATANABE M.F., OISHI S., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W. 1990. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28: 55–64.
- HARADA K.I., MATSUURA K., SUZUKI M., OKA H., WATANABE M.F., OISHI S., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CHARMICHAEL W.W. 1988a. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.* 448: 275–283.
- HARADA K.I., OGAWA K., MATSUURA K., NAGAI H., MURATA H., SUZUKI M., ITEZONO Y., NAKAYAMA N., SHIRAI M., NAKANO M. 1991. Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa*, K-139. *Toxicon* 29: 479–489.
- HARADA K.I., OHTANI I., IWAMOTO K., SUZUKI M., WATANABE M.F., WATANABE M., TERAO K. 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon* 32: 73–84.
- HARADA K.I., SUZUKI M., DAHLEM A.M., BEASLEY V.R., CARMICHAEL W.W., RINEHART K.L. 1988b. Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon* 26: 433–439.
- HARDING W.R., ROWE N., WESSELS J.C., BEATTIE K.A., CODD G.A. 1995. Death of a dog attributed to the cyanobacterial (blue-green algal) hepatotoxin nodularin in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 66(4): 256-259.
- HAWKINS P.R., RUNNEGAR M.T.C., JACKSON A.R.B., FALCONER I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) (*Woloszynska*) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 1292– 1295.
- HITZFELD B.C., HOGER S.J., DIETRICH D.R. 2000. Cyanobacterial toxins: Removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Persp.*, 108: 113-122.
- HOLMES C.F.B. 1991. Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; a highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins. *Toxicon* 29: 469–477.
- HONKANEN R.E., ZWILLER J., MOORE R.E., DAILY S., KHATRA B.S., DUKELOW M., BOYNTON A.L. 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265: 19401–19404.
- HUMMERT C., REICHELT M., LEGRAND C., GRANELI E., LUCKAS B. 1999. Rapid clean-up and effective sample preparation procedure for unambiguous determination of the cyclic peptides microcystin and nodularin. *Chromatographia* 50: 173–180.

- HUMPAGE A., ROSITANO J., BRETAG A., BROWN R., BAKER P., NICHOLSON B., STEENSEN D., 1994. Paralytic shellfish poisons from Australian cyanobacterial blooms. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 45: 761–771.
- ITO E., SATAKE M., YASUMOTO T. 2002. Pathological effects of lyngbyatoxin A upon mice, *Toxicon* 40: 551-556.
- JELLETT J.F., MARKS L.J., STEWART J.E., DOREY M.L., WATSON-WRIGHT W., LAWRENCE J.F. 1992. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. *Toxicon* 30(10): 1143-1156.
- JOCHIMSEN E.M., CARMICHAEL W.W., AN J.S., CARDO D.M., COOKSON S.T., HOLMES C.E., ANTUNES M.B., DE MELO FILHO D.A., LYRA T.M., BARRETO V.S., AZEVEDO S.M., JARVIS W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 338(13): 873-878.
- KELETI G., SYKORA J.L. 1982. Production and properties of cyanobacterial endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 104-109.
- KELETI G., SYKORA J.L., LIPPY E.C., SHAPIRO M.A. 1979. Composition and biological properties of lipopolysaccharides isolated from *Schizothrix calcicola* (Ag) Gomont (Cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology* 38: 471-477.
- KFIR R., JOHANNSEN E., BOTES D.P. 1986. Preparation of anti-cyanoginosin- LA monoclonal antibody. In *Mycotoxins and Phycotoxins, Bioactive Molecules*, vol. 1, Steyn PS, Vlegaar R (eds). Amsterdam: Elsevier, 377–385.
- KOGURE K., TAMPLIN M.L., SIMIDU U., COLWELL R.R. 1988. A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins. *Toxicon*. 26(2): 191-197.
- KONDO S., MATSUMOTO H., YAMADA S., TSUJI K., UENO Y., HARADA K.I. 2000. Immunoaffinity purification method for detection and quantification of microcystins in lake water. *Toxicon* 38: 813–823.
- KRISHNAMURTHY T., CARMICHAEL W.W., SARVER E.W. 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 24: 865–873.
- LAMBERT T.W., BOLAND M.P., HOLMES C.F.B., HRUDEY S.E. 1994. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. *Environ. Science & Technol.* 28: 753–755.
- LAWTON L.A., EDWARDS C., BEATTIE K.A., PLEASANCE S., DEAR G.J., CODD G.A. 1995. Isolation and characterization of microcystins from laboratory cultures and environmental samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Natural Toxins* 3: 50–57.
- LAWTON L.A., EDWARDS C., CODD, G.A. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst* 119: 1525–1530.

- MACKINTOSH C., BEATTIE K.A., KLUMPP S., COHEN P., CODD G.A. 1990. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett.* 264: 187-192.
- MANGER R.L., LEJA L.S., LEE S.Y., HUNGERFORD J.M., WEKELL M.M. 1993. Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins. *Anal. Biochem.* 214(1): 190-194.
- MATSUNAGA S., MOORE R.E., NIEMZURA W.P., CHARMICHAEL W.W. 1989. Anatoxin-a (s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *J. Am. Chem Soc.* 111: 8021-8023.
- MERILUOTO J. 1997. Chromatography of microcystins. *Analytica Chimica Acta* 352: 277-298.
- MERILUOTO J., KINCAID B., SMYTH M.R., WASBERG M. 1998. Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. A*, 810: 226–230.
- MITTAL A., AGARWAL M.K., SHIVPURI D.N. 1979. Respiratory allergy to algae: clinical aspects. *Ann. Allergy.* 42(4): 253-256.
- MOORE R.E., OHTANI I., MOORE B.S., DE KONING C.B., YOSHIDA W.Y., RUNNEGAR M.T.C., CARMICHAEL W.W. 1993. Cyanobacterial toxins. *Gazzetta Chimica Italiana*, 123: 329-336.
- NAGATA S., SOUTOME H., HASEGAWA A., SEKIJIMA M., SUGAMATA M., HARADA K.I., SUGANUMA M., UENO Y. 1995. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Nat. Toxins*, 3: 78–86.
- NAGATA S., TSUTSUMI T., HASEGAWA A., YOSHIDA F., UENO Y. 1997. Enzyme immunoassay for direct determination of microcystins in environmental water. *J. Am. Org. Anal. Chem.*, 80: 408–417.
- NAGATA S., TSUTSUMI T., YOSHIDA F., UENO Y. 1999. A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an antimicrocystin monoclonal antibody. *Nat Toxins*, 7: 49–55.
- NAMIKOSHI M., RINEHART K.L. 1996. Bioactive compounds produced by Cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol.*, 17: 373-384.
- OKINO T., MATSUDA H., MARAKAMI M., YAMAGUCHI K. 1992. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor for the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.*, 34: 501-504.
- ONODERA H., SATAKE M., OSHIMA Y., YASIMOTO T., CARMICHAEL W.W. 1997. New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Nat. Toxins.* 5(4): 146-151.
- OSBORNE N.J., WEBB P.M., SHAW G.R. 2001. The toxins of *Lyngbya majuscula* and their human and ecological health effects. *Environ. Int.* 27(5): 381-392.
- OSHIMA Y., ITAKURA H., LEE K.C., YASUMOTO T., BLACKBURN S., HALLEGRAEFF G. 1993. Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In:

- Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Smayda T.J., Shimizu, Y. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 3, pp. 907-912.
- OSHIMA Y. 1995 Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *J. AOAC Int.*, 78: 528–532.
- OSTENSVIK O., SKULBERG O.M., UNDERDAL B., HORMASABAL V. 1998. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria – A comparative study of bacterial bioassays. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 1117-1124.
- PARK H.D., WATANABE M.F., HARDA K., NAGAI H., SUZUKI M., WATANABE M., HAYASHI H. 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. *Nat. Toxins*. 1(6): 353-360.
- PELANDER A., OJANPERA I., VUORI E. 1998. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins by overpressured layer chromatography. *J. Planar Chromatog.* 11: 365–369.
- POON G.K., PRIESTLEY I.M., HUNT S.M., FAWELL J.K., CODD G.A. 1987. Purification procedure for peptide toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* involving high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.* 387: 551–555.
- POURIA S., DE ANDRADE A., BARBOSA J., CAVALCANTI R.L., BARRETO V.T., WARD C.J., PREISER W., POON G.K., NEILD G.H., CODD G.A. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet.*, 352 (9121): 21-26.
- RAO P.V., BHATTACHARYA R. 1996. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo. *Toxicology*, 114(1): 29-36.
- RAO P.V., BHATTACHARYA R., DASGUPTA S. 1994. Isolation, culture and toxicity of cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* from a freshwater source in India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 878-885.
- RAO P.V., BHATTACHARYA R., PARIDA M.M., JANA A.M., BHASKAR A. 1998. Freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UTEX 2385) induced DNA damage in vivo and in vitro. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 5: 1-6.
- RIVASSEAU C., RACAUD P., DEGUIN A., HENNION M.C. 1999. Development of a bioanalytical phosphatase inhibition test for the monitoring of microcystins in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 394: 243–257.
- SCHIRMER K., DIXON D.G., GREENBERG B.M., BOLS N.C. 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicol.* 127: 129-141.
- SERRES M.H., FLADMARK K.E., DOSKELAN S.O. 2000. An ultrasensitive competitive binding assay for the detection of toxins affecting protein phosphatases. *Toxicon* 38: 347–360.
- SHAEFFER D.J., MALPAS P.B., BARTON L. 1999. Risk assessment of microcystin in dietary *Aphanisomenon flos-aquae*. *Ecotox. Environ. Safety.*, 44: 73-80.
- SHEN X., LAM P.K., SHAW G.R., WICKRAMASINGHE W. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicon*. 40(10): 1499-1501.

- SHIRAHASHI H., MORIMOTO T., NAGATSU A., MURAKAMI N., TATTA K., SAKAKIBARA J., TOKUDA H., NISHINO H. 1996. Antitumor-promoting activities of various synthetic 1-O-acyl-3-O-(6'-O-acyl-beta-D-galactopyranosyl)-sn-glycerols related to natural product from freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* f. *flos-aquae*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 44(7): 1404-1406.
- SIMON J.F., VERNOUX J.P. 1994. Highly sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenol phosphate. *Natural Toxins*, 2: 293–301.
- SIVONEN K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35: 12-24.
- SKULBERG O.M., CARMICHAEL W.W., ANDERSON R.A., MATSUNAGA S., MOORE R.E., SKULBERG R. 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorian strain (*Cyanophyceae*) and its toxins. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 321-329.
- SKULBERG O.M., CARMICHAEL W.W., CODD G.A., SKULBERG R. 1993. Taxonomy of toxic *Cyanophyceae* (Cyanobacteria). In: Falconer I.R. (Ed.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London, pp. 145–164.
- SUEOKA E., SUEOKA N., OKABE S., KOZU T., KOMORI A., OHTA T., SUGANUMA M., KIM S.J., LIM I.K., FUJIKI H. 1997. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 123(8): 413-419.
- SUZUKI H., WATANABE M.F., WU Y., SUGITA T., KITA K., SATO T., WANG X., TANZAWA H., SEKIYA S., SUZUKI N. 1998. Mutagenicity of microcystin-LR in human RSa cells. *Int. J. Mol. Med.*, 2(1): 109-112.
- TAKAI A., MIESKES G. 1991. Inhibitory effect of okadaic acid on the p-nitrophenol phosphate phosphatase activity of protein phosphatases. *Biochem. J.*, 275: 233–239.
- TEIXERA M., COSTA M., CARVALHO V., PEREIRA M., HAGE E. 1993. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. *Bull. Pan. Am. Hlth. Org.*, 27: 244-253.
- TENEVA I., ASPARUHOVA D., DZHAMBAZOV B., MLADENOV R., SCHIRMER K. 2003. The freshwater cyanobacterium *Lyngbya aerugineo-coerulea* produces compounds toxic to mice and to mammalian and fish cells. *Environ. Toxicol.*, 18(1): 9-20.
- TSUJI K., NAITO S., KONDO F., WATANABE M.F., SUZUKI S., NAKAZAWA H., SUZUKI M., SHIMADA T., HARADA K. 1994. A clean-up method for analysis of trace amounts of microcystins in lake water. *Toxicon* 32: 1251–1259.
- TSUTSUMI T., NAGATA S., HASEGAWA A., UENO Y. 2000a. Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water. *Food Chem. Toxicol.* 38: 593–597.
- TSUTSUMI T., NAGATA S., YOSHIDA F., HARADA K.I., UENO Y. 2000b Development and application of highly sensitive anti-immune complex ELISAs for microcystins in tap water. *Food Agric. Immunol.* 12: 231–241.
- TURNER P.C., GAMMIE A.J., HOLLINRAKE K., CODD G.A. 1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. *B.M.J.*, 300(6737): 1440-1441.

- UENO Y., NAGATA S., TSUTSUMI T., HASEGAWA A., WATANABE M.F., PARK H.D., CHEN G.C., CHEN G., YU S.Z. 1996. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis*, 17(6): 1317-1321.
- USLEBER E., RENZ V., MARTLBAUER E., TERPLAN G. 1991. Studies on the application of enzyme immunoassays for the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 39(8): 617-627.
- VAN DOLAH F.M., FINLEY E.L., HAYNES B.L., DOUCETTE G.J., MOELLER P.D., RAMSDELL J.S. 1994. Development of rapid and sensitive high throughput pharmacologic assays for marine phycotoxins. *Nat. Toxins*, 2(4): 189-196.
- WEISE G., DREWS G., JANN B., JANN K. 1970. Identifikation and analysis of a lipopolysaccharide in cell walls of the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Archives Microbiology*, 71: 89-98.
- WONG B.S.F., LAM P.K.S, XU L-H, ZHANG Y-U, RICHARDSON B.J. 1999. A colorimetric assay for screening microcystin class compounds in aquatic systems. *Chemosphere*, 38: 1113-1122.
- YOSHIZAWA S., MATSUSHIMA R., WATANABE M.F., HARADA K.I., ICHIHARA A., CARMICHAEL W.W., FUJIKI H. 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116: 609-614.
- YU S-Z. 1989. Drinking water and primary liver cancer. In: *Primary Liver Cancer* (Tang Z.Y., Wu M.C., Xia S.S. eds.), New York/China Academic Publishers/Springer, pp. 30-37.
- YUAN M., NAMIKOSHI M., OTSUKI A., RINEHART K.L., SIVONEN K., WATANABE, M.F. 1999a. Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 34: 33-43.
- YUAN M., NAMIKOSHI M., OTSUKI A., SIVONEN, K. 1998. Effect of amino acid side-chain on fragmentation of cyclic peptide ions: differences of electrospray ionization collision-induced decomposition mass spectra of toxic heptapeptide microcystins containing ADMAdda instead of Adda. *Eur. Mass Spectrom.* 4: 287-298.
- YUAN M., NAMIKOSHI M., OTSUKI A., WATANABE M.F., RINEHART K.L. 1999b. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: Modulation of charge states and $[M+H]^+$ to $[M+Na]^+$ ratio. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10: 1138-1151.

AN OVERVIEW OF THE TOXIN PRODUCING CYANOPROKARYOTA

CYANOTOXINS – CLASSIFICATION, MECHANISM OF ACTION, METHODS FOR DETECTION, ECOLOGICAL RISK

Ivanka Teneva^{1,2}, Balik Dzhambazov², Kristin Schirmer¹, Rumen Mladenov²

¹ *UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany*

² *University of Plovdiv, Tsar Assen 24, 4000 Plovdiv, Bulgaria*

(Summary)

Blue-green algae (Cyanoprokaryota) are increasingly gaining importance in view of health hazards and ecological risks caused by secondary metabolites with toxic properties named “cyanotoxins”. More than 40 Cyanoprokaryota species are capable to form blooms and produce cyanotoxins. The most common and well studied producers of cyanotoxins are *Microcystis aeruginosa*, *Aphanisomenon flos-aquae*, *Anabaena flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix agardhii*, *Lyngbya majuscula*, *Nodularia* and *Oscillatoria*. This review contains background information on the biology of Cyanoprokaryota and summarizes what is known regarding the most common cyanoprocarotic neurotoxins (anatoxin-a, homoanatoxin-a, anatoxin-a(s), saxitoxins, neosaxitoxins), hepatotoxins (microcystins, nodularin, cylindrospermopsin), dermatotoxins (lyngbyatoxin-A, aplysiatoxins) and lipopolysaccharides, their mechanisms of action in general and with specific emphasis on the human health effects. Biological (*in vivo* and *in vitro* assays), biochemical/immunological (ELISA, enzyme and receptor assays) and physicochemical (HPLC, GC-ECD, LC-PDA, LC-MS, MALDI-TOF MS) methods for detection and identification of cyanotoxins are reviewed and discussed.

