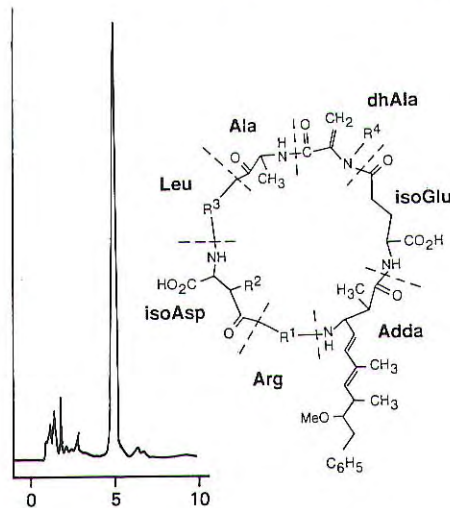
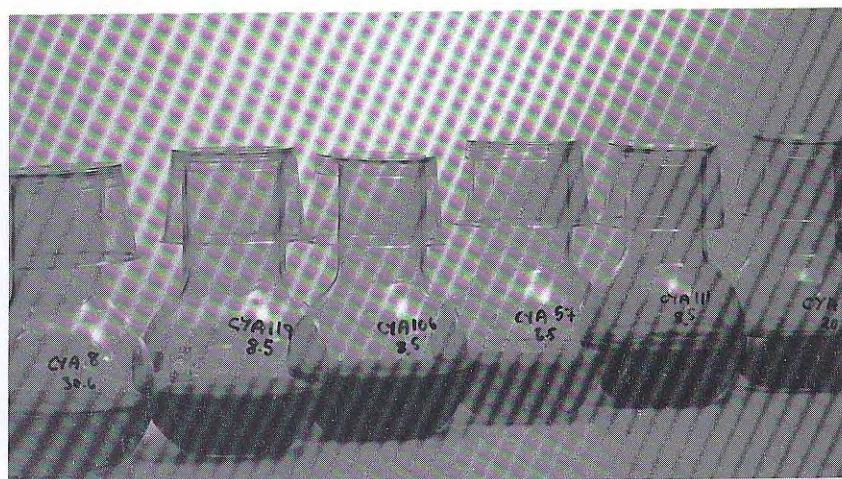


# Blågrønnalger – vannkvalitet

02/16

## Toksiner. Lukt- og smaksstoffer. Nitrogenbinding





# NIVA - RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning



NIVA

**Hovedkontor**  
Postboks 333  
0314 Oslo 3  
Telefon (02) 23 52 80

**Sørlandsavdelingen**  
Grooseveien 36  
4890 Grimstad  
Telefon (041) 43 033

**Østlandsavdelingen**  
Rute 866  
2312 Ottestad  
Telefon (065) 76 752

**Vestlandsavdelingen**  
Breiviken 2  
5035 Bergen - Sandviken  
Telefon (05) 25 97 00

Prosjektnr.: O-87006
Undernummer:
Løpnummer: 2116
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:  BLÅGRØNNALGER - VANNKVALITET  Toksiner. Lukt- og smaksstoffer. Nitrogenbinding.	Dato: 15.mars 1988
	Prosjektnummer: O-87006
Forfatter (e):  Olav Skulberg	Faggruppe: Hydrobiologi
	Geografisk område: Norge
	Antall sider (inkl. bilag): 121

Oppdragsgiver: Statens forurensningstilsyn (SFT)	Oppdragsg. ref. (evt. NTNf-nr.):
---	----------------------------------

Ekstrakt: <p>Blågrønnalger (CYANOPHYCEAE, cyanobakterier) påvirker vannkvalitet gjennom bl.a. dannelse av sekundære metabolitter og sin nitrogenbinding.</p> <p>Det er påvist mer enn 20 arter blågrønnalger med toksinproduserende stammer. Toksinene omfatter polypeptider, alkaloider og fenoler. Stoffene har hepatotoksisk, nevrotoksisk eller dermatotoksisk virkning.</p> <p>Luktmetabolitter dannes av flere vanlige blågrønnalger i plankton og benthos. Forskningsfeltet kjemisk økologi vil få stor betydning for vannressursforvaltning.</p> <p>Nitrogenbinding er en viktig biologisk prosess i nordlige geografiske områder. I Norge er det foreløpig bare gjort innledende undersøkelser av nitrogenbinding i akvatiske lokaliteter.</p>
--

4 emneord, norske:

1. Blågrønnalger (CYANOPHYCEAE)
2. Toksiner
3. Luktmetabolitter
4. Nitrogenbinding

4 emneord, engelske:

1. Blue-green algae (CYANOPHYCEAE)
2. Toxins
3. Off-flavour substances
4. Nitrogen fixation

Prosjektleder:

*Olav Skulberg*

For administrasjonen:

*Reiner J. Schenck*

ISBN - 82-577-1394-5

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING  
Oslo

O-87006

## BLÅGRØNNALGER - VANNKVALITET

**Toksiner. Lukt- og smaksstoffer. Nitrogenbinding.**

Rapport utarbeidet til Statens forurensningstilsyn (SFT)

Oslo, 15.03.1988

Olav Skulberg

## F O R O R D

Statens forurensningstilsyn (SFT) har bidratt til å finansiere undersøkelser ved NIVA for å kartlegge hvordan blågrønnalger påvirker vannkvalitet. Spesielt har blågrønnalgenes toksindannelse hatt oppmerksomhet, men deres produksjon av andre sekundære metabolitter med praktisk interesse har også blitt studert. Videre er et forskningsarbeid om blågrønnalgenes nitrogenbinding blitt tatt opp.

Resultatene har foreløpig hovedsakelig blitt publisert i fagartikler i vitenskapelige tidsskrifter. Imidlertid er det behov også for en rapportering som kan være egnet i generell sammenheng. Denne rapport er utarbeidet til et slikt formål.

Siden 1985 har Norges teknisk- naturvitenskapelige forskningsråd (NTNF) støttet forskningsprosjektet TOKSINPRODUSERENDE BLÅGRØNNALGER I NORSKE VANNFOREKOMSTER. De forskningsmiljøer og personer som har arbeidet i dette prosjektet har fremskaffet mye av resultatene benyttet i rapporten. Spesielt bør nevnes: Professor Bjarne Underdal og dr.scient. Kjetil Berg, Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole; forsker Lasse Berglind, Norsk institutt for vannforskning; dr.philos. Hans Chr. Utkilen, Statens institutt for folkehelse og forsker Christel Benestad, Senter for industriforskning.

Avsnittet om lukt- og smaksstoffer er laget med bakgrunn i resultater fra SFT-finansiert forskning ved NIVA. Vi har på dette fagfelt hatt et fruktbart samarbeid med bl.a.: Dr. Per-Edvin Persson, Universitetet i Helsinki, Finland.

Når det gjelder avsnittet om nitrogenbinding, er det i stor grad basert på resultater som ble oppnådd ved SFT-finansiert forskningsvirksomhet i 1986. Det praktiske arbeidet ble hovedsakelig utført av: M.Sc. Beatrix Kiss, Eötvös University of Science, Budapest (gjesteforsker ved NIVA) og forsker Jozsef Kotai, Norsk institutt for vannforskning.

I forskning med blågrønnalger er bruken av levende materiale og kulturer av største viktighet. Arbeid og ansvar for dette har vært ivare tatt av: Randi Skulberg, Norsk institutt for vannforskning.

Alle som har hjulpet til i arbeidet med rapporten - faglig, praktisk og økonomisk - takkes for innsatsen.

Oslo, 15. mars 1988

Olav Skulberg



## INNHOLDSFORTEGNELSE

	Side:
FORORD	2
SAMMENFATNING	8
<b>BLÅGRØNNALGER – VANNKVALITET</b>	<b>12</b>
Innledning	13
Gamle organismer med ny aktualitet	13
<b>TOKSINPRODUSERENDE BLÅGRØNNALGER</b>	<b>17</b>
Giftige alger	18
Klassifisering av fagfeltet - biotoksikologi	18
Forekomst av algeforgiftninger	20
Organismene	25
Giftstoffene	32
Toksiner av peptidnatur	34
Toksiner av alkaloidnatur	36
Toksiner av fenolnatur	39
Giftvirkninger og giftighet	39
Nevrotoksiner	40
Hepatotoksiner	40
Dermatotoksiner	41
Lipopolysakkarider (LPS) og allergiske reaksjoner	43
Økologiske forhold	44
Generelt	44
Eutrofiering - vannblomst	44
Utbredelse av giftig vannblomst	47
Toksinenes opptreden	49
Faktorer som påvirker toksinproduksjon	51
Akutt forgiftning	52
Hydrobiologiske innvirkninger	53
Påvisning og analysering av blågrønnalgetoksiner	56
Akutte toksisitetstester	56
Kjemiske analyser	56
Noen enheter og definisjoner	58
Generell drøftelse	59
Praktisk vurdering og forebyggende tiltak	62
Toksinproduserende blågrønnalger. Norske rapporter og publikasjoner	64



<b>BLÅGRØNNALGER – LUKT OG SMAK</b>	69
Aktuelle mikroorganismer	70
Lukt- og smaksstoffer	71
Sekundær metabolisme og sekundære metabolitter	71
Kjemiske forutsetninger og stoffer	74
Biologiske forutsetninger og stoffproduksjon	76
Sensorisk påvirkning av vann	77
Glåma som eksempel	77
Kjemisk økologi	82
Vannets sensoriske egenskaper – forurensning	83
Blågrønnalger – lukt og smak. Norske rapporter og publikasjoner	85
<b>BLÅGRØNNALGER – NITROGENBINDING</b>	88
Problemstilling	89
Nitrogenkretsløpet	89
Nitrogenbinding som fenomen	92
Observasjoner av nitrogenbinding	96
Metodisk grunnlag	96
Felt- og laboratorieundersøkelser	97
Et regneeksempel på årlig nitrogenbinding	103
Blågrønnalgenes nitrogenbinding og praktisk vannressursforvaltning	103
Blågrønnalger – nitrogenbinding. Norske rapporter og publikasjoner	105
<b>HENVISNINGER</b>	106



## TABELLOVERSIKT

	Side:
Tabell 1. Generell oversikt over blågrønnalgene	16
Tabell 2. Eksempler på praktiske problemer med vannblomst og toksinproduserende blågrønnalger i Norge.	23
Tabell 3. Arter av blågrønnalger (CYANOPHYCEAE) med hittil påviste toksinproduserende stammer	30
Tabell 4. Eksempler på kloner av blågrønnalger med toksinproduksjon	32
Tabell 5. Oversikt over påviste blågrønnalgetoksiner	33
Tabell 6. Sammenlikning av giftighet til et utvalg av biotoksiner	39
Tabell 7. Norske innsjøer hvor det hittil er påvist toksiske blågrønnalger	48
Tabell 8. Karakteriserende data for <u>Microcystis aeruginosa</u> , Akersvatnet, Vestfold	50
Tabell 9. Arter av blågrønnalger (CYANOPHYCEAE) med påvist produksjon av lukt- og smaksstoffer	71
Tabell 10. Sammenlikning av primære og sekundære metabolitter	72
Tabell 11. Eksempel på kjemiske forbindelser som gir lukt- og smakspåvirkning av vann	75
Tabell 12. Resultater av gasskromatografisk bestemmelse av geosmin i benthos	81
Tabell 13. Eksempler på konsentrasjoner og mengder av blågrønnalger i Glåmas vannmasser i en vegetasjonsperiode (1976) med lukt- og smaksproblemer	82
Tabell 14. Eksempler på noen nitrogenbindende organismer	91
Tabell 15. Oversikt over viktige slekter av blågrønnalger med nitrogenbindende arter	96
Tabell 16. Hydrokjemiske forhold i innsjøene. Prøver innsamlet 27.08.1986.	98
Tabell 17. Påvisning av nitrogenbinding og nitrogenaseaktivitet. Prøver innsamlet 27.08.1986	98
Tabell 18. Langen, Akershus - 05.09.1986. Observasjoner av hydrografiske forhold og nitrogenbinding	100
Tabell 19. Forholdet mellom nitrogen- og fosforforbindelser i Langens vannmasser. Prøvetaking 05.09.1986.	101



## FIGUROVERSIKT

	Side:
Figur 1. Eksempler på organisasjonsstruktur til blågrønnalger	15
Figur 2. Forskningsfelt og praktisk sammenheng	19
Figur 3. Geografiske hovedområder med rapporterte forekomster av toksinproduserende blågrønnalger	21
Figur 4. Land i Europa med rapporterte tilfeller av blågrønnalgeforgiftninger. Resultat av rundspørring i 1980	22
Figur 5. Foreløpig oversikt over lokaliteter hvor det er påvist populasjoner med toksinproduserende blågrønnalger i Norge (1980-87).	24
Figur 6. <u>Microcystis aeruginosa</u> Kütz.	26
Figur 7. <u>Anabaena flos-aquae</u> (Lyngb.) Bréb.	27
Figur 8. <u>Aphanizomenon flos-aquae</u> (L.) Ralfs	28
Figur 9. <u>Oscillatoria agardhii</u> Gom.	29
Figur 10. Prinsipp for bruk av kulturer til forskningsformål	31
Figur 11. Microcystin-a (akerstox). Toksin isolert og karakterisert fra <u>Microcystis aeruginosa</u> i Akersvatnet, Vestfold	35
Figur 12. Molekylstruktur av toksin isolert fra <u>Nodularia spumigena</u>	36
Figur 13. Molekylstruktur av toksin isolert fra <u>Anabaena flos-aquae</u> , anatoksin-a	37
Figur 14. Molekylstruktur av toksin isolert fra <u>Aphanizomenon flos-aquae</u> , aphantoksin (saxitoksin)	37
Figur 15. Molekylstruktur av toksin isolert fra <u>Lyngbya majuscula</u> , lyngbyatoksin-a	38
Figur 16. Molekylstruktur av toksin isolert fra <u>Schizothrix calcicola</u> , debromoaplysiatoksin	38
Figur 17. Virkninger av microcystin observert på forsøksdyr som har mottatt dødelig dose	42
Figur 18. Eksempler på algevekstpotensial i vann fra innsjøer med ulike innhold av næringssalter	46

Figur 19.	Eksempler på biomasse under algeoppblomstringer	47
Figur 20.	Karbonstoffsifte og dannelse av sekundære metabolitter hos blågrønnalger	73
Figur 21.	Biosynteseveien for terpenoider med forløperne for geosmin og metylisoborneol	73
Figur 22.	Algeutvikling i benthos og sensorisk påvirkning av vannkvalitet. Glåma ved Solbergfoss, Østfold, 1984.	79
Figur 23.	Nitrogenets kretsløp i en vannforekomst	90
Figur 24.	Organismesamfunn med nitrogenbinding	93
Figur 25.	Skjematisk fremstilling av nitrogenbindingsprosessen	94
Figur 26.	Innsjøen Langen (Akershus) med nedbørfelt	99
Figur 27.	Hydrografiske forhold i Langen. Prøvetaking 5. september 1986	102
Figur 28.	Feltobservasjoner av nitrogenbinding i Langen. Målinger utført 5. september 1986	102

## SAMMENFATNING

### Toksinproduserende blågrønnalger

- Blågrønnalgene er prokaryoter utviklet i tidlig prekambrisk tid. De utgjør en gruppe fotosyntetiske mikroorganismer med forekomst i luft, vann og jord. I næringsrike vannforekomster kan blågrønnalgene utvikle masseforekomst (vannblomst). Blågrønnalgene har stor betydning i sin påvirkning av vannkvalitet med sekundære metabolitter (toksiner, lukt- og smaksstoffer) og gjennom evnen til nitrogenbinding.
- Studiet av blågrønnalger med toksinproduksjon er en del av fagfeltet biotoksikologi. I økologisk sammenheng brukes betegnelsen allelopati om skadelige innvirkninger av kjemisk natur mellom organismer. De toksikologiske virkninger studeres innenfor bl.a. humanmedisin og veterinærmedisin.
- Blågrønnalgeforgiftninger er beskrevet fra mange geografiske områder. I Europa er det rapportert om forgiftningstilfeller i tolv land. Undersøkelsene som er gjort i Norge har vist at blågrønnalger med toksinproduksjon er forholdsvis vidt utbredt. I omlag 60% av innsjøer med blågrønnalgeoppblomstringer er det dominans av toksinproduserende stammer. Fremskridende eutrofiering bidrar til å utvide problemet med toksiske blågrønnalger i vannforekomstene.
- Av de omlag 2000 beskrevne arter med blågrønnalger er det foreløpig beskrevet 20 arter med toksinproduserende stammer. De mest aktuelle artene i Norge hører til slektene Microcystis, Anabaena, Aphanizomenon og Oscillatoria. I NIVAs organismesamling holdes omkring 20 kloner med påvist toksinproduksjon. Disse representerer 8 arter av blågrønnalger.
- Det dreier seg sannsynligvis om mer enn femten toksiner som blir dannet av blågrønnalger. Bare et lite antall av disse er hittil kjemisk karakterisert. De kjemiske forbindelser som er klarlagt hører hovedsakelig til stoffgruppene alkaloider og polypeptider. Toksinene betegnes foreløpig etter organismene som produserer dem (eks. microcystin, anatoksin, aphantoksin, oscillatoriatoksin).
- Toksinene som blågrønnalger danner hører til kategorien ekstremt giftige stoffer. Dødelig dose for microcystin-a (akerstox) er f.eks. bestemt til  $LD_{50} = 50 \mu\text{g pr. kg kroppsvekt}$ . Polypeptidene som inngår er i første rekke hepatotoksiner (levergifter). De er for-



holdsvis langsomtvirkende (død inntreffer omlag 45-180 minutter etter mottatt dødelig dose). Alkaloidene det gjelder, er nevrotoksiner (virker inn på nervesystemet). Kort død tid - omlag 5-10 minutter etter mottatt dødelig dose - er karakteristisk. Andre forgiftningssymptomer av blågrønnalgetoksiner omfatter hudirritasjoner av forskjellig type (virkninger av dermatotoksiner).

- Det er påvist at blågrønnalger også produserer lipopolysakkarider (LPS) med bl.a. helsemessige konsekvenser. Disse stoffene er knyttet til celleveggene og virker som antigener. Blågrønnalgenes innhold av lipopolysakkarider er viktige ved vurdering av vannkvalitet for drikkevannsforsyning.
- Eutrofiering er en forutsetning for masseutvikling av blågrønnalger. De kjemiske forhold ved vannet har konsekvenser både for den kvalitative side ved blågrønnalgevegetasjonen (artssammensetning) såvel som for blågrønnalgenes mengdemessige utvikling (biomasse).
- Under vanlige vekstforhold er toksinene knyttet til cellene. Ved ødeleggelse av celleveggene (f.eks. nedbrytning av vannblomstmateriale) kommer toksinene ut i vannfasen. Det er et forholdsvis høyt innhold av toksiner i cellene som produserer dem. Vekstbetingelser (lys, temperatur, næring osv.) influerer på toksindannelsen, men også fysiologisk rase og utviklingsstadium har avgjørende betydning. De genetiske forhold knyttet til blågrønnalgenes toksinproduksjon er under utforskning.
- Virkninger som giftproduserende blågrønnalger har overfor andre komponenter i økosystemet er et omfattende forskningsfelt. Det er rapportert virkninger av toksinene overfor bl.a. alger, krepsdyr, fisk og varmblodige dyr. Problemstillingen om blågrønnalgetoksineres muligheter til anrikning gjennom næringskjeder er foreløpig lite belyst.
- Biologiske og kjemiske fremgangsmåter benyttes til påvisning og analysering av blågrønnalgetoksiner. Akutte toksisitetstester utføres med laboratoriedyr. Mest benyttet er intraperitoneal injeksjon av toksin i mus med etterfølgende observasjoner av forgiftningssymptomer, samt registrering av fysiologiske og cytologiske forandringer. Det foreligger gode kjemiske analysemetoder for et fåtall av de aktuelle toksinene. Den vanligste fremgangsmåte er basert på bruk av høytrykksvæskekromatografi (HPLC).

- Blågrønnalgetoksiner kan lage praktiske problemer for vannforsyninger, rekreasjonsmessig bruk av vann og akvakultur. Det er derfor behov for overvåking og undersøkelser av mulig utvikling av toksinproduserende stammer av blågrønnalger. Eutrofibegrensende tiltak - som retter seg mot årsakene til masseutvikling av blågrønnalger - vil være de beste praktiske forholdsregler. Helsemyndighetene ved de lokale helseråd er faglig instans for vurdering av helsefare og tilretteleggelse av eventuelle sikrings-tiltak i aktuell sammenheng.

### Blågrønnalger - Lukt og smak

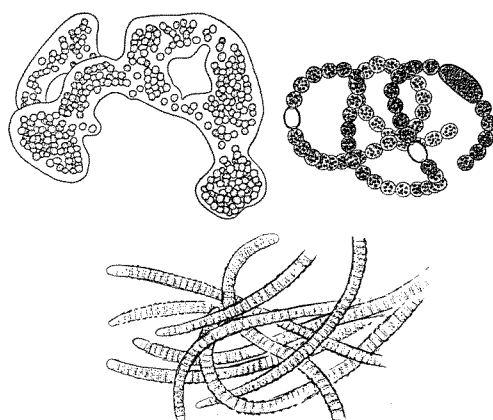
- Lukt og smaksstoffer dannet av mikroorganismer kan medføre betydelig sanitær og annen ulempe. Det er i særlig grad blågrønnalger og actinomyceter som lager slike problemer for bruk av vann.
- De aktuelle stoffskifteproduktene hører til gruppen sekundære metabolitter. Biosynteseveien for noen av stoffene begynner å bli kjent (f.eks. geosmin, 2-metylisoborneol). Stoffene betegnes luktmetabolitter (VOBS - volatile organic biogenic substances).
- For vannressursforvaltning er vannets sensoriske egenskaper av stor betydning. Det er behov for å etablere sensoriske kvalitetskrav til vann i praktisk sammenheng.
- Utviklingen av algevegetasjon i Glåma ble undersøkt med hensyn til påvirkning av vannkvalitet med luktmetabolitter. Det gjorde seg gjeldende markerte sesongmessige vekslinger i lukt- og smakspåvirkning av vannmassene i takt med organismeutviklingen. Blågrønnalger var et fremtredende element i vegetasjonen (i plankton og benthos). Spesielt slekten Oscillatoria bidro til å sette et preg på vannet gjennom produksjon av luktmetabolitter som geosmin og 2-metylisoborneol.
- Det ble foretatt en bedømmelse av sammenheng mellom algeutvikling og grad av påvirkning av vannkvalitet. Begroingsamfunnet av blågrønnalger på 1 m<sup>2</sup> bunnareal kan sette lukt og smak på en vannmasse tilsvarende 1000-4000 m<sup>3</sup>. Hvis en geosminproduserende stamme av Oscillatoria er til stede i en konsentrasjon av 0,5 cm<sup>3</sup>·m<sup>-3</sup>, vil vannet tydelig være preget av jordaktig lukt.
- Fagfeltet kjemisk økologi omhandler bl.a. hvordan luktmetabolitter har betydning for livsutfoldelsen i vann. Det finner sted kjemisk kommunikasjon mellom organismer. Vannets sensoriske egenskaper påvirkes også av forurensninger. Dette kan innebære forstyrrelse eller ødeleggelse av sansingens funksjon for organismer. Slike forhold trenger oppmerksomhet i sammenheng med ressursforvaltning og vurdering av vannforurensning.

### Blågrønnalger - Nitrogenbinding

- Molekylært nitrogen kan benyttes av noen prokaryoter til syntese av organiske nitrogenforbindelser. Disse organismene (enkelte bakterier - ca. 60 stammer og blågrønnalger - ca. 125 stammer) er til dels frittlevende, tildels inngår de i symbiose med andre. Nitrogenbinding ved mikrobiologisk aktivitet er essensiell for hele biosfærens nitrogenstatus.
- Kjemisk består den biologiske nitrogenbinding i at elementært nitrogen blir redusert til ammoniakk. Dette foregår ved en katalytisk reaksjon gjennom enzymsystemet nitrogenase. Enzymet er meget følsomt for fritt oksygen, og kan bare virke under anaerobe forhold. Blågrønnalgene har utviklet heterocyster, og de gir fysiologiske forutsetninger for nitrogenbinding under ordinære voksestedsbetingelser.
- Acetylen-reduksjonstesten har størst praktisk betydning ved den kjemiske måling av nitrogenbinding. Nitrogenase reduserer acetylen spesifikt til etylen, og etylen kan bestemmes ved konvensjonell massespektrometri eller ved bruk av gass-væskekromatografi.
- Blågrønnalgen Anabaena solitaria f. smithii hadde høsten 1986 oppblomstring i innsjøen Langen, Akershus. En aktiv nitrogenbinding ble observert 5. september 1986. Maksimum var i 2,5 m dyp ( $0,039 \mu\text{mol etylen} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{time}^{-1}$ ). Forholdene var likevel ikke optimale for nitrogenbindingsprosessen. Den årlige nitrogenbinding i Langen - basert på hypotetiske forutsetninger - vil etter dette være av størrelsesorden 2,24 tonn N. Det er få observasjoner fra Norge å sammenlikne med, men også i Oslofjorden er det målt nitrogenbinding av tilsvarende intensitet.
- Nitrogenbinding er en biologisk prosess av vesentlig betydning for stoffskifte i vannforekomstene. Prosessens viktighet i naturen er gjerne økende mot polare områder og med høyden over havet. Med fremskridende eutrofiering tiltar betydningen av blågrønnalgenes nitrogenbinding. For norske forhold gjelder det at nitrogenbinding i vann praktisk talt ennå ikke er undersøkt.



# Blågrønnalger - vannkvalitet



## INNLEDNING

Forurensning av vann er i mange tilfeller årsak til masseutvikling av blågrønnalger. Gjennom sine stoffskifteprodukter påvirker blågrønnalgene vannets kvalitet. Stor forekomst av blågrønnalger kan gjøre vannet uegnet til praktisk bruk, medføre forgiftningsfare eller medvirke til å fremme eutrofiering. Denne rapport behandler tre problemstillinger som er viktige i slik praktisk sammenheng:

- Toksiner. Flere blågrønnalger er i nyere tid blitt påvist å kunne produsere giftstoffer med konsekvenser for vannhygiene og økologiske forhold.
- Lukt- og smaksstoffer. Blågrønnalgene hører - sammen med bl.a. actinomycetene - til de mest betydningsfulle organismer som sensorisk påvirker vannkvalitet. Dette skyldes produksjon av kjemiske forbindelser som gir lukt- og smaksreaksjoner.
- Nitrogenbinding. Frodig utvikling av blågrønnalger er et karakteristisk fenomen i næringsrikt vann. Det viser seg at blågrønnalgene er såvel årsak til, som resultat av eutrofiering. Gjennom sin nitrogenbinding kan blågrønnalgene bidra til å gjøre vann fruktbart, og påvirke hele eutrofieringsforløpet (ferskvann, brakkvann og saltvann).

For å gi problemene som behandles en naturhistorisk bakgrunn, er det først laget en kortfattet oversikt over blågrønnalgene som biologisk fenomen.

## GAMLE ORGANISMER MED NY AKTUALITET

Tidlig i jordens historie var blågrønnalger en dominerende organisme-gruppe. Fossiler av vegetasjon med blågrønnalger er funnet i sedimenter fra tidlig prekambrisk tid. Alderen til disse fossilene er mer enn tretusen millioner år (Brock 1973). I denne perioden var blågrønnalgene jordklodens viktigste primærprodusenter. De dannet gjennom sin fotosyntetiske aktivitet elementært oksygen til atmosfæren. Dette ga forutsetning for utvikling av aerob metabolisme, og dermed for høyere vegetasjon og dyreliv.

Blågrønnalgene - også betegnet cyanobakterier - er en særpreget gruppe av fotosyntetiske mikroorganismer. I forbindelse med utviklingen av organismelivet danner de et ledd mellom bakterier og grønne planter (Fogg et al. 1973). Cellene til blågrønnalgene likner bakteriernes celletype (prokaryot). Membranbundne organeller mangler. Ekte cellekjerne, kloroplaste og mitokondrier er ikke tilstede. Det gene-

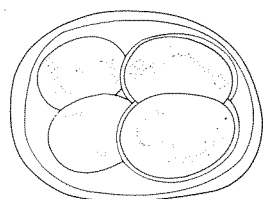
tiske materialet, fotosynteseapparatet og respirasjonssystemet er ikke avgrenset fra resten av cellen med særskilte membraner. Blågrønnalgenes prinsipielle ernæringsmåte er imidlertid fotosyntese med utskillelse av oksygen. På denne måten er de fysiologisk lik alger og høyere planter (eukaryoter). Et spesielt trekk ved blågrønnalgene er at flere arter er i stand til å bruke luftnitrogen som nitrogenkilde til sine livsprosesser. Disse blågrønnalgene er dermed de mest utpregede selvforsynte organismer (autotrofe) som finnes, og klarer seg med lys (energi), luft, vann og mineraler til full livsutfoldelse.

Vegetasjon av blågrønnalger er lett synlig under mange forhold. Masseforekomst gir opphav til vannblomst (Skulberg 1965), eller fargede begroinger på strender o.l. Organismene som inngår i vegetasjonen er imidlertid av mikroskopisk størrelse. De må derfor undersøkes i optisk - eller elektron-mikroskop. En stor form-rikdom gjør seg gjeldende. De prinsipielle organisasjonsstrukturer omfatter gjerne typer som er encellet, koloniformet, enkelt trådformet eller greinet trådformet (Fritsch 1952, Geitler 1932). Den systematiske inndeling av blågrønnalgene i ordener er i stor utstrekning basert på disse morfologiske karakterer (Figur 1).

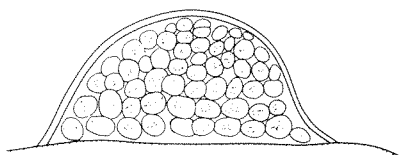
Blågrønnalgene har en stor økologisk betydning. De finnes vidt utbredt over jordkloden. De danner vegetasjon i luft, vann og jord. I vann forekommer blågrønnalgene som fastsittende organismer (benthos) eller frittflytende i vannmasser (plankton). De kan utvikle seg i et stort område av saltholdighet (ferskvann-saltvann). Det er typisk for blågrønnalger at de kan leve under ekstreme miljøbetingelser. Vegetasjon av blågrønnalger finnes der det er tørt (ørkener), kaldt (polarstrøk), varmt (varme kilder), lyst (fjellsider), mørkt (huler) osv. Blågrønnalgene danner vanlig pionersamfunn på nye koloniserbare områder (nytt land, erosjonsområder, impedimenter). Sammen med andre organismer kan blågrønnalgene inngå i viktige symbioseformer. Mest utbredt er organismegruppen lav (Lichenophyta), hvor en sopp (mycobiont) lever i samspill med en alge (phycobiont). Arter av blågrønnalger er økologisk viktige i denne sammenheng.

Forurensning medfører ofte at nye miljøforhold blir dannet, og kan f.eks. gi opphav til ekstreme miljøbetingelser. Dette skaper gjerne situasjoner hvor blågrønnalger profiterer. Invasjoner av arter, og masseutvikling av blågrønnalger er karakteristiske biologiske fenomener knyttet til forurensningssituasjoner (Skulberg 1981). Blågrønnalgene inntar derfor en viktig rolle ved undersøkelser av forurensningsvirkninger (indikatorarter, indikatorsamfunn; VanLandingham 1982).





Encellet – isopolar  
(Orden *Chroococcales*)



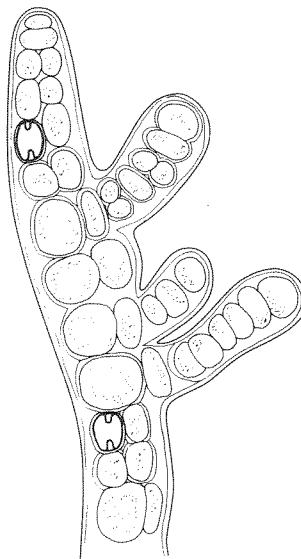
Pseudoparenkymatisk  
(Orden *Pleurocapsales*)



Flercellet – trichal  
(Orden *Nostocales*)



Encellet – heteropolar  
(Orden *Chamaesiphonales*)



Flercellet – trichal, med ekte forgreininger  
(Orden *Stigonematales*)

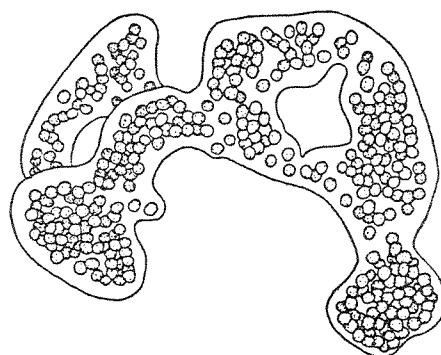
Figur 1. Eksempler på organisasjonsstruktur til blågrønnalger.

Interessen for blågrønnalgene - vitenskapelig og praktisk - har øket sterkt i de siste tiår. Det er flere grunner til dette. Vannforurensning har bl.a. medført at blågrønnalger stadig blir et problem for bruken av vannressursene. Behovet for å vite om årsakene til masseutvikling av blågrønnalger og metoder for å unngå vanskeligheter, er aktualisert i industrilandene. Samtidig er det voksende forståelse for at blågrønnalgene rommer et viktig potensiale - nyttiggjøring - for menneskenes økonomi. Dette gjelder bl.a. i forbindelse med verdens matvaresituasjon og energiproblemer. Men samtidig representerer blågrønnalgene et spesielt egnet modell-system for studier av fundamentale molekylarbiologiske prosesser. Dette gir blågrønnalgene en sentral plass i utviklingen av bioteknologi (Abelson 1984) og ressursutnyttelse (Tabell 1).

Tabell 1. Generell oversikt over blågrønnalgene

SYSTEMATIKK	Schizophyta: <u>Cyanophyceae</u> . Prokaryoter oppstått i tidlig prekambrium. Omfatter 5 ordener, 25 familier og 150 slekter. Omlag 2000 nålevende arter.	van den Hoek, 1978
FYSIOLOGI	Autotrofe (fotolithotrofe) organismer. Fotosyntesepigmenter omfatter klorofyll a, phycocyanin, phycoerythrin. Mangler mitochondrier, Golgi-apparat og endoplasmatisk retikulum. Opplagsnæring er cyanophycetivelse og cyanophycin. De formerer seg vegetativt, seksuell forplantning er ikke til stede.	Carr et al., 1982
ØKOLOGI	Utbredt over hele jordkloden, i luft, jord og vann. I vann utvikler de seg i benthos og plankton. Kan vokse på lokaliteter med ekstreme miljøbetingelser. Lever i symbiose med andre planter (f.eks. lav). Flere arter kan gjennomføre nitrogenbinding.	Fogg et al., 1973
PRAKTISK BETYDNING	Masseutvikling av blågrønnalger kan lage problemer for bruk av vann. De produserer sekundære metabolitter som påvirker vannkvalitet (bl.a. lukt- og smaksstoffer, toksiner). Viktige som indikatorarter ved biologisk vannanalyse. Økonomisk betydningsfulle som mat og forplanter, i landbruk og bioteknologi (fytokjemi).	Fay and van Baalen, 1987

# Toksinproduserende blågrønnalger





## GIFTIGE ALGER

Alger med giftproduserende stammer forekommer i ferskvann, brakkvann og saltvann. Det er arter fra flere systematiske klasser som er kjent for å ha slike egenskaper. I ferskvann er det særlig arter av blågrønnalger (klasse Cyanophyceae) som medfører forgiftningstilfeller. Fra brakkvannsområder er flagellaten Prymnesium parvum (klasse Haptophyceae) en velkjent årsak til omfattende fiskedød. Dinoflagellater (klasse Dinophyceae) er beskrevet fra mange kystområder av verden med enkelte arter som er giftproduserende. Også innenfor andre algegrupper - f.eks. gullalger (klasse Chrysophyceae) - er det organismer som kan danne giftstoffer.

Det vil i denne rapport bli gitt et perspektiv på arbeidet med de aktuelle problemer, og hva bestrebelsene går ut på. Det er algeoppvekst og toksindannelse av blågrønnalger som blir behandlet. Når det dukker opp situasjoner med utvikling av giftige alger i våre vannforekomster, er det nødvendig å kjenne til og vite hvordan vi skal forholde oss. Samtidig vil utforskningen av de aktuelle fenomener kaste lys inn i problemområder som har den største interesse, såvel for naturvitenskap som for samfunnets daglige, praktiske behov.

## KLASSIFISERING AV FAGFELTET - BIOTOKSIKOLOGI

Studiet av giftige planter og dyr og virkningene som de aktuelle giftstoffer lager, betegnes for biotoksikologi. Begrepet gift brukes da i vid betydning, om stoffer som medfører at en organisme blir skadet gjennom kjemiske påvirkninger strukturelt eller funksjonelt, og som i økende konsentrasjoner fører til organismens død. Umiddelbart merkbare giftvirkninger og toksiske langtidsvirkninger gjør seg gjeldende. Virkningene av biotoksiner omfatter foruten akutte og kroniske intoksisasjoner, også deres betydning for reproduksjon, teratogenitet, mutagenitet, tumorigenitet, kanserogenitet og allergenitet. Utover giftvirkningene på den enkelte organisme kommer konsekvensene i den økologiske sammenheng. Det tenkes her på biotoksinenes innvirkning på populasjoner og samfunn av organismer og deres økosystemer.

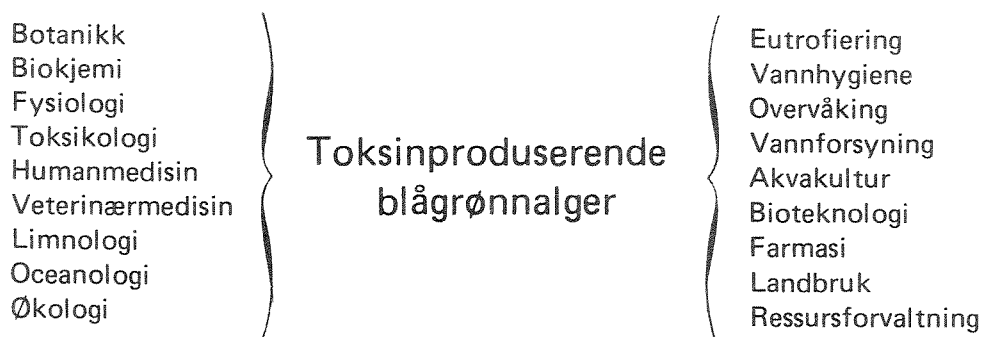
I den økologiske sammenheng brukes ofte betegnelsen allelapati om skadelige innvirkninger av kjemisk natur mellom organismer. Da begrepet allelopatti ble introdusert i vitenskapelig terminologi av Molisch i 1937, var det klar forståelse for at biokjemiske påvirkninger ikke bare gjorde seg gjeldende mellom planter innbyrdes, men også mellom planter og dyr. Imidlertid ble begrepet i første rekke knyttet til kjemiske interaksjoner mellom planter og mikroorganismer. Først i ny

tid (Rice 1974) er allelopati-begrepet blitt tatt i bruk på en utvidet måte, hvor alle direkte eller indirekte skadelige effekter av biokjemiske påvirkninger mellom organismer er inkludert. Dette betyr at f.eks. algetoksiner studeres under fenomen-betegnelsen allelopati.

I nyere tid er begrepet miljøgifter innført om stoffer som har betydelig negativ virkning i biosfæren. Det har vært vanskelig å gi begrepet en entydig avgrensning. Dette fremgår bl.a. av hvordan biotoksinene vanligvis faller utenfor i behandling av problemene miljøgiftene omfatter (Moriarty 1983). Likevel er det klart at studiet av algegiftene (phycotoksiner) hører inn under fagområdet økotoksikologi som omfatter studiet av:

- Gifteffekter av kjemiske og fysiske agenser på levende organismer, spesielt på populasjoner og samfunn innen definerte økosystemer, og overføringsveier for disse agensene og deres interaksjon med miljøet.

Basisfag for studiet av algetoksiner er derfor foruten generell toksikologi - med dets elementer av fysiologi, biokjemi, cellebiologi og genetikk - særlig økologi og analytisk kjemi. I økologisk sammenheng har hydrobiologi både knyttet til marine og limniske systemer en sentral rolle i dette forskningsfelt (Figur 2).



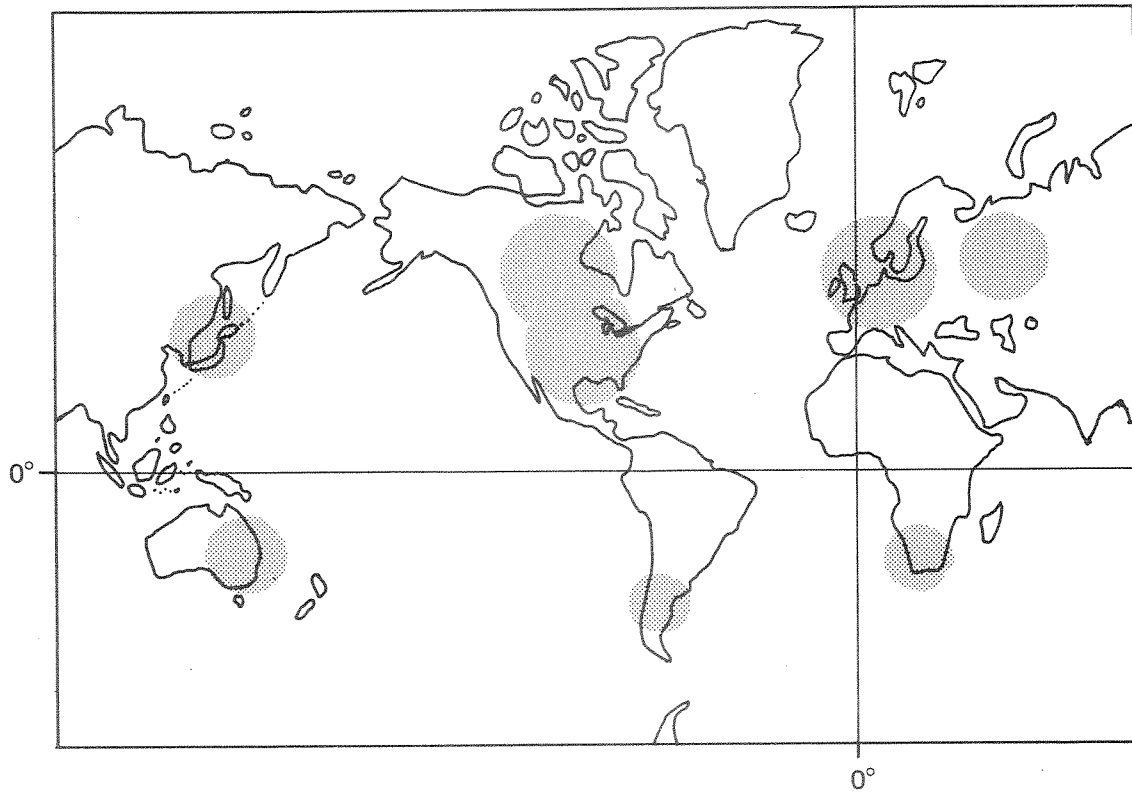
Figur 2. Forskningsfelt og praktisk sammenheng.

Den vitenskapelige og praktiske betydning som utforskningen av algenes biotoksiner har, er ofte undervurdert. Det er selvsagt nødvendig å få kjennskap til de aktuelle giftstoffene og hvordan de dannes for å unngå forgiftninger og praktiske problemer. Men perspektivet er langt større. Resultatene av denne forskningsvirksomhet har vesentlige bidrag å gi både teoretisk og i sammenheng med bl.a. bioteknologi og akvakultur (Figur 2). Samtidig rettes oppmerksomhet mot fenomener som gir en ny dimensjon i vår erkjennelse av vann som medium for liv. Et utvidet vannkvalitetsbegrep fremstår. Det medfører en rekke konsekvenser for det videre vitenskapelige arbeid, og for den praktiske ressursforvaltning av vannforekomstene.

### FOREKOMST AV ALGEFORGIFTNINGER

Utbredelsen av giftige alger og problemer med forgiftninger av algeopprikkelse er rapportert fra alle verdensdeler (Schwimmer & Schwimmer 1955). Selv om fenomenet er kjent fra gammel tid både i ferskvann og saltvann (Carmichael 1981), har det utvilsomt vært en tendens med økende forekomst av slike forgiftningsepisoder over hele verden i løpet av de siste dekadene. Eutrofiering av havområder og ferskvannforekomster er en viktig faktor i denne sammenheng. Dette gir forutsetninger for bl.a. masseutvikling av alger inkludert toksindannende arter. Men et annet forhold kommer også inn. Etter hvert som kunnskapen om fenomenet giftige alger utvikles, blir det en større oppmerksomhet på de aktuelle problemene. Analytiske hjelpemidler tas i bruk, undersøkelser blir utført. Dette innebærer en effektiv akkumulering av ny informasjon om algeforgiftninger på verdensbasis.

Med hensyn til problemer knyttet til giftvirkninger av blågrønnalger, har disse foreløpig hatt relativ liten oppmerksomhet i internasjonal forskning sammenliknet med de som f.eks. dinoflagellatene representerer. Årsakene til dette er sikkert flere. Det forhold at forgiftning og dødsfall på grunn av toksiner produsert av blågrønnalger først og fremst har rammet husdyr, kan være en medvirkende faktor. Likevel er det nå klarlagt at biotoksiner dannet av blågrønnalger utgjør problemer med global utbredelse såvel i ferskvann som saltvann (Skulberg et al. 1984). Med bakgrunn i beskrevne tilfeller av alvorlige blågrønnalgeforgiftninger, kan noen aktuelle geografiske områder nevnes (Figur 3). På det nordamerikanske kontinent er det en rekke rapporter om forgiftningsepisoder i USA og Canada. I Søramerika er særlig Argentina kjent med slike forhold. Problemet er utbredt i Sør-Afrika og Australia. Innenfor det eurasiske området er det dokumenterte tilfeller bl.a. i Japan, Sovjetsamveldet og Vesteuropa. Det kan understrekes at dette bildet som er tegnet mer gjenspeiler hvor undersøkelser er



Figur 3. Geografiske hovedområder med rapporterte forekomster av toksinproduserende blågrønnalger.

utført, enn den reelle geografiske utbredelse av organismene og problemene det dreier seg om. Noen erfaringer fra Europa kan illustrere dette forhold.

For å fremskaffe holdepunkter om situasjonen i Europa når det gjelder giftproduserende blågrønnalger ble det i 1980 gjort en henvendelse fra Norsk institutt for vannforskning til myndigheter i samtlige land i Europa. Materialet som ble resultatet av rundspørringen er benyttet for oppstillingen i Figur 4. Her er det gitt en oversikt over geografisk utbredelse av forgiftningstilfeller med blågrønnalger. Av de 28 land som henvendelsen omfattet, var det rapportert forgiftningstilfeller i 12 land, mens det i 6 land ikke var rapportert slike tilfeller. For de øvrige 10 land var det ufullstendige eller manglende informasjon.



Figur 4. Land i Europa med rapporterte tilfeller av blågrønnalgeforgiftninger. Resultat av rundspørring i 1980.

Det synes ikke å ha vært dokumentert dødelige tilfeller av blågrønnalgeforgiftninger direkte hos mennesker, selv om sykdomstilfeller ofte har blitt rapportert. Unntak danner imidlertid den såkalte Haffsykdom, som har hatt dødelig utfall for mennesker, såvel i Europa som i andre verdensdeler. Denne sykdom synes imidlertid å kunne forklares ut fra et annet grunnlag enn toksinnhold i blågrønnalgene (Birger et al. 1973). Haffsykdom følger av akutt B-vitaminmangel. Blågrønnalger kan tilføre fisk som brukes til menneskemat, unormalt store mengder thiaminase. Dette enzymet spalter thiamin (vitamin B<sub>1</sub>). Mennesker som spiser fisk som inneholder en dødelig dose av enzymet, omkommer i paralyse (lammelser).

I nyere tid er det foretatt flere undersøkelser for påvisning av populasjoner med toksinproduserende blågrønnalger i enkelte geografiske områder av Europa. Resultater fra England viser (Richard et al. 1982)



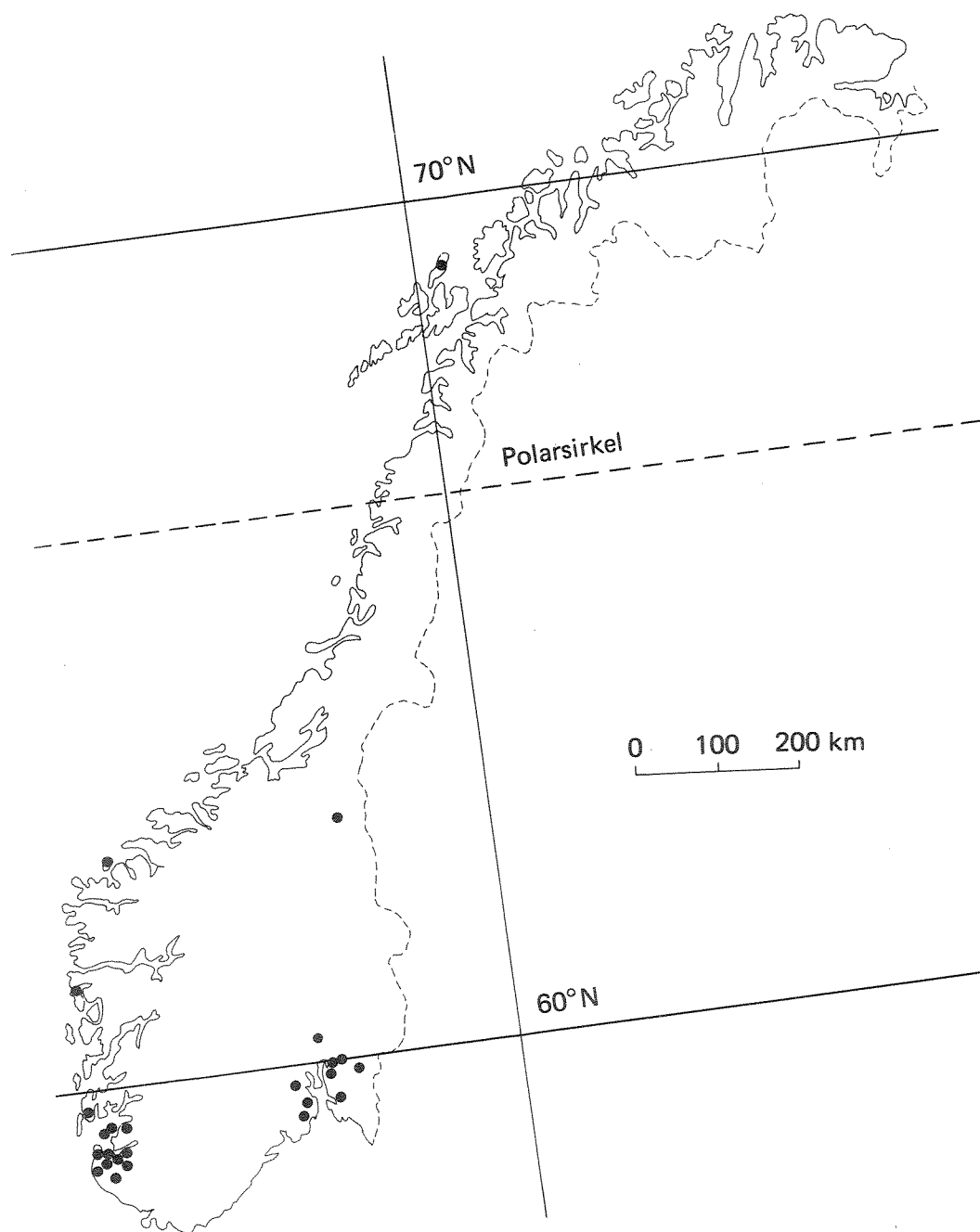
at vannblomst med giftige egenskaper er vanlig utbredt på de britiske øyer. Tilsvarende observasjoner fra Nederland (Leeuwangh et al. 1983) dokumenterte at ni av ti undersøkte eutrofe lokaliteter hadde oppblomstringer med blågrønnalger av toksindannende typer. Regionale undersøkelser av forekomst av giftige blågrønnalger i Norge og Sverige har hittil resultert i påvisning av blågrønnalgestammer med toksinproduserende egenskaper i omlag 60 % av undersøkte innsjøer med blågrønnalgeoppblomstringer (Berg et al. 1986). Observasjonene som er gjort gir klare indikasjoner på at toksinproduserende blågrønnalger både er vanlige og vidt utbredt. Dessuten viser resultatene at når betingelser for vannblomst er til stede, så kan det bli masseutvikling også av toksiske stammer. Giftige blågrønnalger er ikke noen kuriositet, det er et regelmessig forekommende fenomen i vårt geografiske område (Tabell 2; Figur 5).

Tabell 2. Eksempler på praktiske problemer med vannblomst og toksinproduserende blågrønnalger i Norge

ÅRSTALL	LOKALITET	PROBLEM	ORGANISME
1971	Goksjø, Vestfold	Dødsfall - måker	Anabaena flos-aquae
1972	Bjerkreim, Rogaland	Dødsfall - sauer	Microcystis aeruginosa
1974	Frøylandsvatn, Rogaland	Dødsfall - fisk	Anabaena flos-aquae
1978 *	Frøylandsvatn, Rogaland	Dødsfall - storfe	Microcystis aeruginosa
1979	Gjersjøen, Akershus	Vannblomst - toksisk stamme	Oscillatoria agardhii var.
1980	Vansjø, Østfold	Vannblomst - toksisk stamme	Oscillatoria agardhii var. isothrix
1981	Edlandsvatn, Rogaland	Dødsfall - fisk	Anabaena flos-aquae
1982	Frøylandsvatn, Rogaland	Dødsfall - storfe og sauer	Microcystis aeruginosa
1983	Viksevatn, Rogaland	Dødsfall - storfe	Aphanizomenon flos-aquae
1984	Akersvatn, Vestfold	Vannblomst - toksisk stamme, drikkevannsforsyning	Microcystis aeruginosa
1985 **	Langevatn, Hordaland	Vannblomst - vannforsyning ødelagt	Anabaena flos-aquae
1986	Akersvatn, Vestfold	Vannblomst - toksisk stamme, drikkevannsforsyning	Microcystis aeruginosa
1987	Hjørungdalsvatn Møre og Romsdal	Vannblomst - toksisk stamme, fiskeoppdrettsanlegg	Anabaena flos-aquae

\* Først i 1978 ble det faglig dokumentert at blågrønnalger var årsak til forgiftninger i Norge (Skulberg 1979).

\*\* I 1985 var det omlag femti henvendelser til NIVA om problemer med masseutvikling av blågrønnalger.



Figur 5. Foreløpig oversikt over lokaliteter hvor det er påvist populasjoner med toksinproduserende blågrønnalger i Norge (1980-87).

## ORGANISMENE

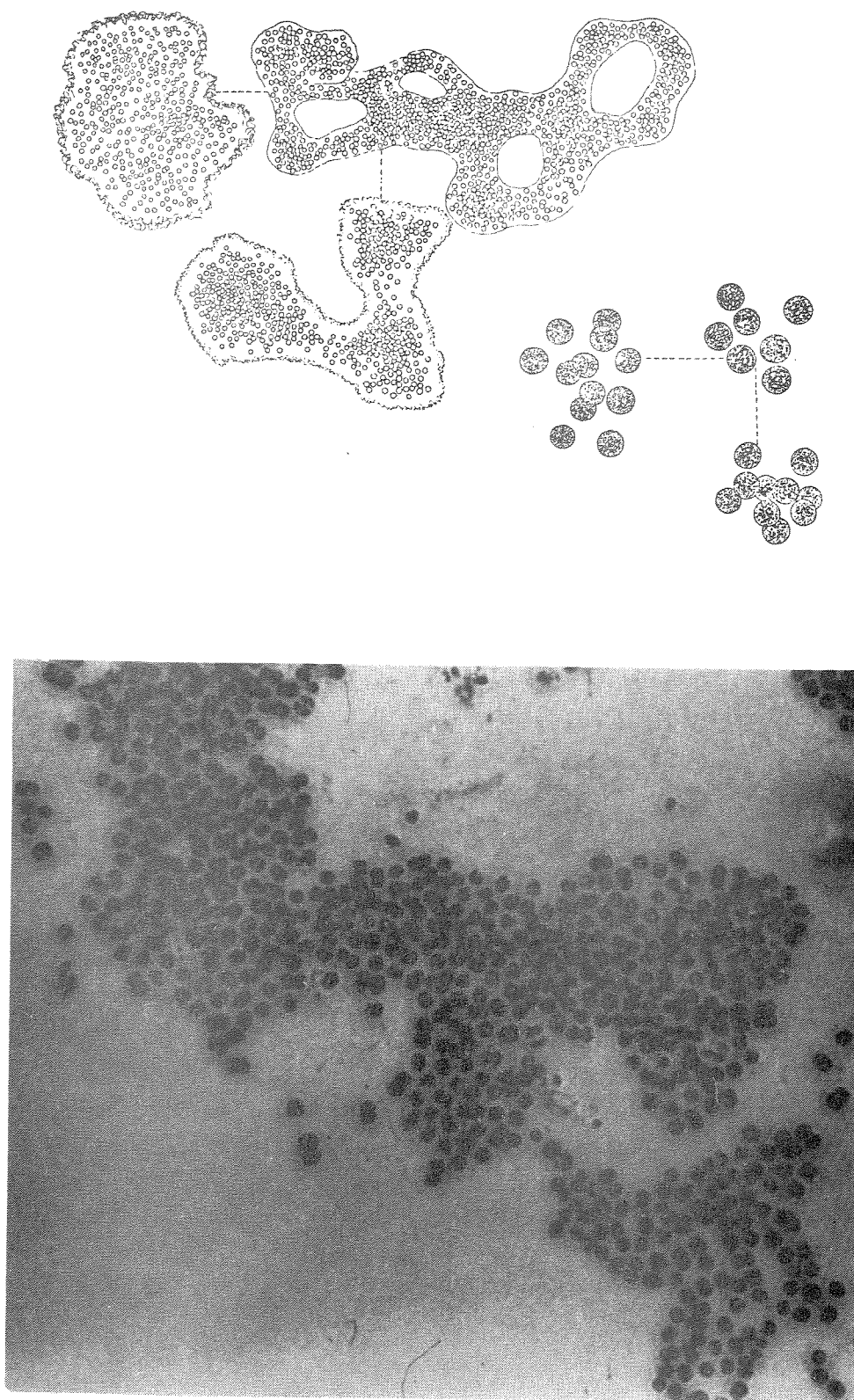
Blant de omlag 2000 beskrevne arter av blågrønnalger (van den Hoek 1978) er det bare et forholdsvis lite antall som er påvist å kunne danne toksiner. Fysiologiske undersøkelser av disse artene i kultur viser at de kan opptre i toksinproduserende og ikke toksinproduserende stammer (Gorham 1964, Skulberg et. al. 1984).

Oversikten i Tabell 3 omfatter de kjente arter med toksinproduserende stammer. Forskningsarbeidet som blir utført vil avdekke flere arter med toksigene egenskaper både i saltvann og ferskvann. Listen vil derfor utvilsomt vokse i årene som kommer. Med få unntak er det planktoniske blågrønnalger som er påvist som giftige. Dette har nok i stor grad sammenheng med at det gjerne er vannblomst (Skulberg 1972) som danner forutsetning for praktiske problemer med giftproduserende blågrønnalger. Det er imidlertid grunn til å anta at også benthiske arter besitter tilsvarende egenskaper (dessuten organismer med forekomst i jord). Det er behov for videre undersøkelser for å avklare hvordan toksigene arter er fordelt gjennom hele klassen Cyanophyceae. Dette vil kunne ha stor betydning både for taksonomiske vurderinger og for anvendte problemstillinger.

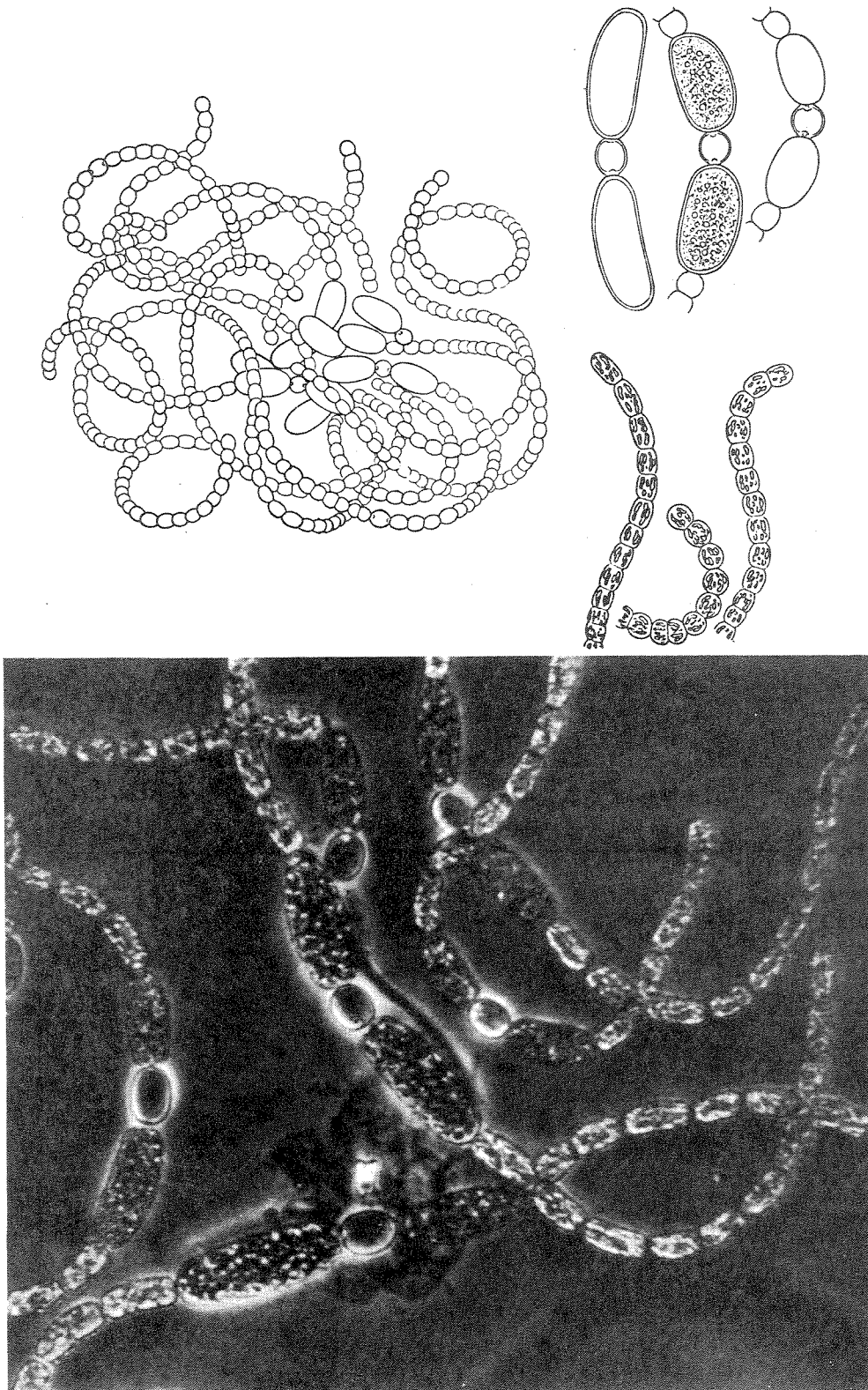
Noen viktige arter av toksinproduserende blågrønnalger er illustrert i figurene 6-9.

Blågrønnalgenes systematiske behandling er fremdeles på mange måter provisorisk (Rippka et al. 1979). En gjennomgåelse av litteraturen om giftproduserende blågrønnalger viser at det tildels er et mangelfullt bestemmelsesarbeid som er utført. Det hefter derfor fremdeles usikkerhet rundt angivelse av arter med toksinproduserende stammer. For å kunne gjøre en identifikasjon med stor grad av pålitelighet er det nødvendig å foreta sammenliknende studier av blågrønnalger i kultur (Skulberg and Skulberg 1985).

En revidert klassifisering av blågrønnalgene er under utarbeidelse. Foreløpig behandles disse organismene samtidig og parallelt innenfor International Code of Botanical Nomenclature (ICBN) og International Code of Nomenclature of Bacteria (ICNB). Ved de aktuelle revisjoner av gruppen (bl.a. nye utgaver av Bergeys Manual of Determinative Bacteriology og Süßwasserflora Mitteleuropas - Begründet von A. Pascher) vil betydningen av referansesamlinger av levende organismer bli fremhevet. Med hensyn til International Code of Nomenclature of Bacteria forutsetter denne bl.a. at typer og neotyper av organismene er representert med kulturer i organisesamlinger. Det blir viktig å følge dette opp også ved forskningsarbeidet knyttet til toksinproduserende blågrønnalger.

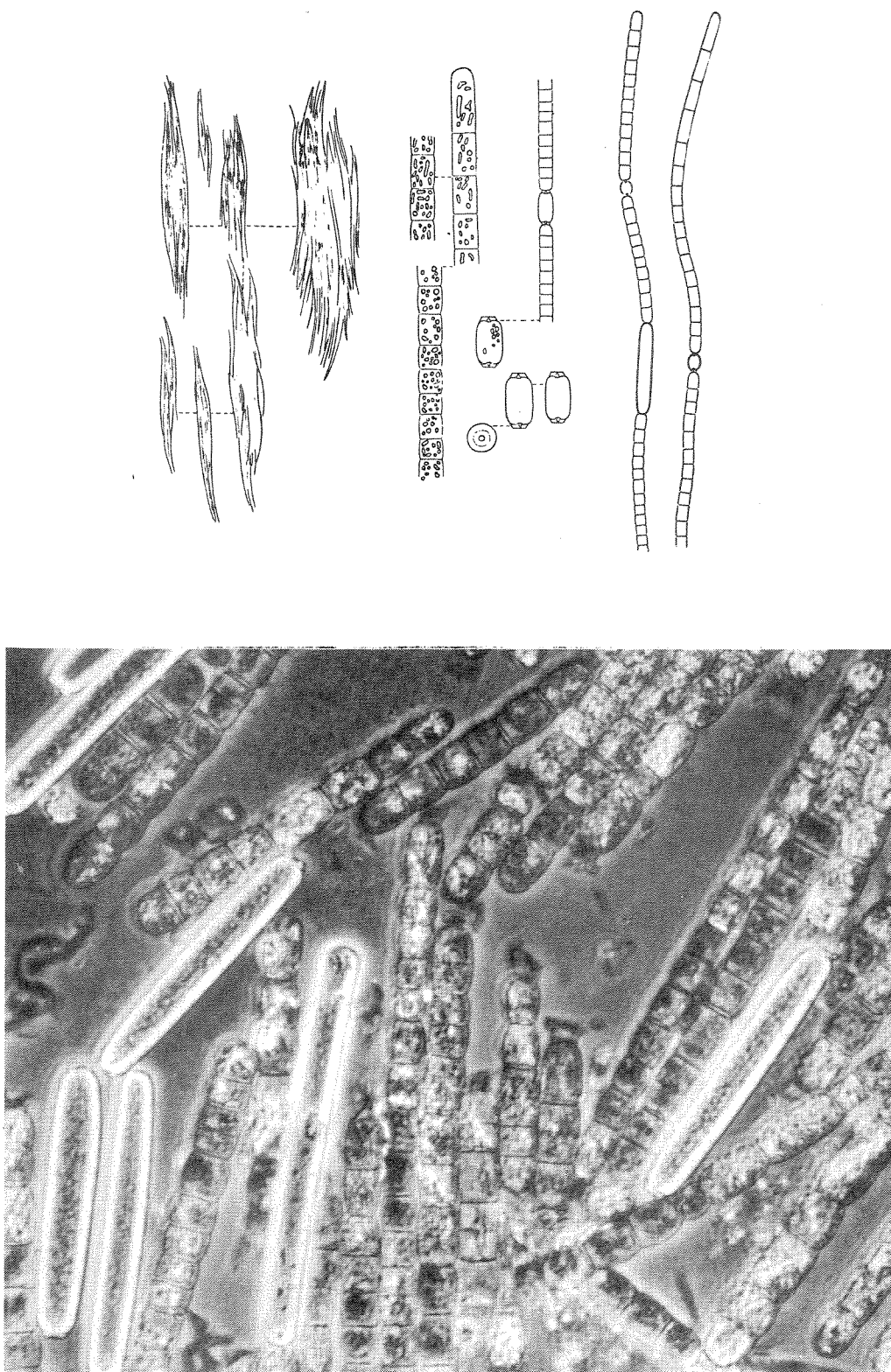


Figur 6. Microcystis aeruginosa Kütz. (Cellediameter 3-7  $\mu\text{m}$ ).  
Tegning etter Komárek 1958.

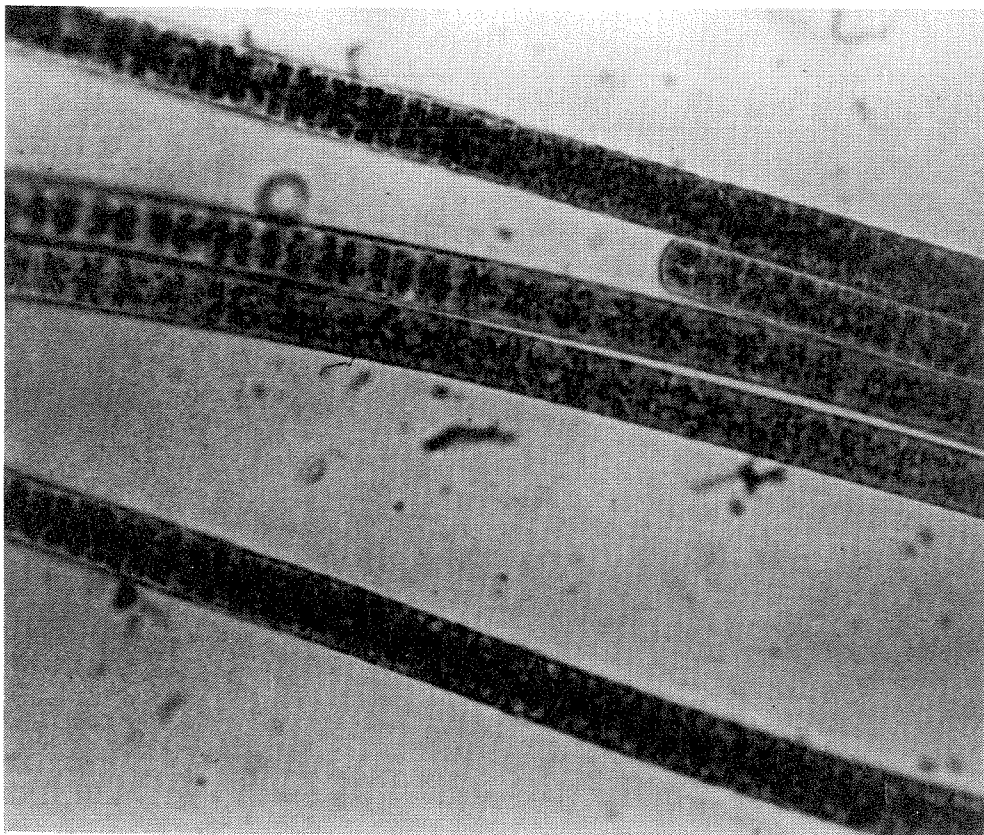
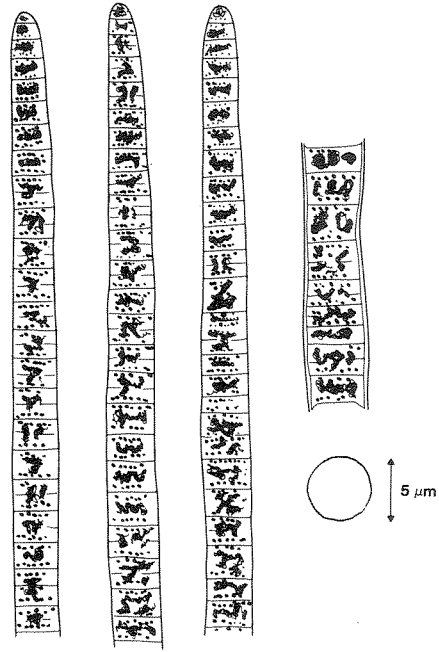


Figur 7. *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) Bréb. (Trichomdiameter 4-8  $\mu\text{m}$ ).  
Tegning etter Komárek 1958.





Figur 8. Aphanizomenon flos-aquae (L.) Ralfs (Trichomdiameter 5-6  $\mu\text{m}$ )  
Tegning etter Komárek 1958.



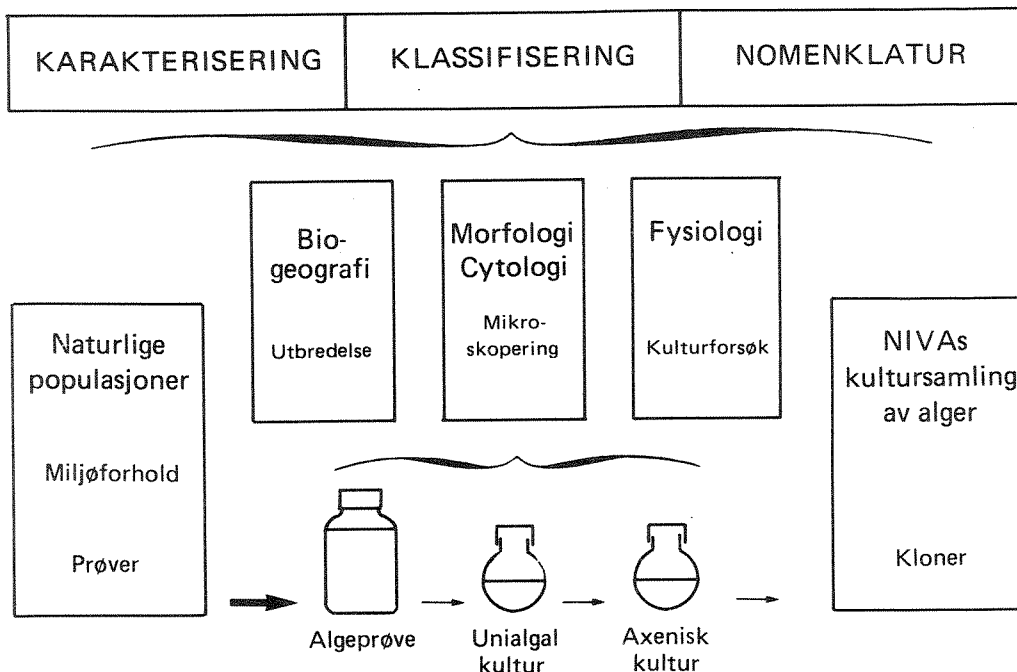
Figur 9. Oscillatoria agardhii Gom. (Trichomdiameter 4-6 μm)

Tabell 3. Arter av blågrønnalger (CYANOPHYCEAE) med hittil påviste toksinproduserende stammer

ORDEN	FAMILIE	SLEKT OG ART
CHROOCOCCALES	Chroococcaceae	Coelosphaerium kützingianum Näg. Gomphosphaeria lacustris Chodat Microcystis aeruginosa Kütz. Microcystis cf. botrys Teil. Microcystis viridis (A.Br.) Lemm. Microcystis wesenbergii Kom.
HORMOGONALES	Rivulariaceae	Gloeotrichia echinulata (J.E. Smith) P. Richt.
	Nostocaceae	Anabaena circinalis Rabenh. Anabaena flos-aquae (Lyngb.) Bréb. Anabaena spiroides Klebahn Aphanizomenon flos-aquae (L.) Ralfs Cylindrospermopsis raciborskii (Wol.) Seenaya & Subba Raju Nodularia spumigena Mertens
	Oscillatoriaceae	Lyngbya majuscula Harvey Oscillatoria agardhii Gom. Oscillatoria agardhii var. isothrix Skuja Oscillatoria agardhii Gom. var. Oscillatoria formosa Bory Oscillatoria nigroviridis Thwaites Oscillatoria rubescens DC. Schizothrix calcicola (Ag.) Gom. Trichodesmium erythraeum Ehrb.

De grunnleggende studier som førte frem til dyrkningsmetoder for blågrønnalger (Hughes et al. 1954), banet på mange måter vegen for utforskningen også av de toksinproduserende arter. Det foreligger nå detaljerte beskrivelser av hvordan blågrønnalger blir tatt i kultur og rutinemessig kan dyrkes opp til forsøksformål (Stein 1973, Carmichael 1985).

Kultursamlinger inntar en sentral rolle i hele det eksperimentelle arbeidet med blågrønnalger. Elementer som virksomheten er satt sammen av fremgår av den skjematisk fremstilling i figur 10.



Figur 10. Prinsipp for bruk av kulturer til forskningsformål.

Det er flere kultursamlinger av mikroorganismer som har stammer av toksinproduserende blågrønnalger. Viktige kultursamlinger er bl.a. (1987):

- Sammlung von Algenkulturen, Göttingen, Vest-Tyskland
- American Type Culture Collection, Maryland, USA
- Pasteur Culture Collection of Cyanobacterial Strains, Paris, Frankrike
- Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, England
- Culture Collection of Algae, Trebon, Tsjekkoslovakia

Fra NIVA's kultursamling (Nr. 498, World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms) har det blitt testet 47 kloner av blågrønnalger. Det ble påvist toksinproduksjon hos 20 kloner, som representerer 8 arter/former. Tabell 4 viser eksempler på slike stammer.

Nødvendigheten av å bruke axeniske kulturer til spesielle fysiologiske og biokjemiske studier av blågrønnalgetoksiner sier seg selv. Det er velkjent (Fogg et al. 1973) at en rekke mikroorganismer lever nær knyttet til blågrønnalger under naturlige forhold. I blågrønnalgens slimkapper er det f.eks. regelmessig å finne bakterier, gjerne av

gram-negativ type. Disse kommensalier produserer tildels vitaminer og metallchelatorer som kan være viktige for blågrønnalgene. Men de kan også eventuelt produsere stoffer med hemmende virkning for blågrønnalger og andre organismer (allelopatiske forbindelser). Slike bakterier kan derfor være forstyrrende for undersøkelser av toksindannelsen til blågrønnalger. Det er i de senere år fremkommet vesentlig erfaring med fremstilling av axeniske kulturer av blågrønnalger, og detaljerte bruksbeskrivelser av metoder er utarbeidet (Carmichael et al. 1982; Rippka et al. 1981).

Tabell 4. Eksempler på kloner av blågrønnalger med toksinproduksjon

KLON-NUMMER	ARTER	LOKALITET OG ISOLERINGSÅR	REFERANSE
NIVA-CYA32 (=NRC-44-1)	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Lake Burton, Canada, 1961	Gorham et al., 1964
NIVA-CYA83/1	<i>Anabaena flos-aquae</i>	Edlandsvatnet, 1981	Berg et al., 1986
NIVA-CYA57	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Frøylandsvatnet, 1978	Skulberg, 1979
NIVA-CYA228/1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Akersvatnet, 1987	Berg et al., 1986
NIVA-CYA29	<i>Oscillatoria agardhii</i>	Gjersjøen 1968	Skulberg, 1968
NIVA-CYA56/1	<i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i>	Steinsfjorden, 1978	Skulberg, 1978
NIVA-CYA65	<i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i>	Vansjø, 1979	Skulberg, 1980
NIVA-CYA18	<i>Oscillatoria agardhii</i> var.	Gjersjøen, 1971	Skulberg, 1978
NIVA-CYA1	<i>Oscillatoria rubescens</i>	Lake Zürich, 1958	Staub, 1961
NIVA-CYA55	<i>Oscillatoria rubescens</i> var.	Steinsfjorden, 1978	Skulberg, 1964

## GIFTSTOFFENE

Selv om forgiftninger med blågrønnalger er beskrevet fra gammel tid (Francis 1878), har kjennskapet til toksinene det gjelder først fremkommet i nyeste tid.

Undersøkelser av de aktuelle arter av blågrønnalger med giftproduserende stammer har vist at det er mer enn femten toksiner som inngår i



forgiftningsbildet. Det finnes fremdeles ikke noen systematisk utarbeidet nomenklatur for disse toksinene. Toksinene blir tildels angitt med navn etter organismen som produserer stoffene. Tabell 5 viser en oversikt over de viktigste blågrønnalgetoksinene som inntil nå er påvist (Skulberg et al. 1984). Bare noen få av disse stoffene er hittil blitt kjemisk identifisert og toksikologisk studert (Toerien et al. 1976; Carmichael 1986). Det er imidlertid klarlagt at de kjemiske forbindelser det gjelder, hovedsakelig fordeler seg mellom stoffgruppene alkaloider (heterocykliske, nitrogenholdige baser med utpreget fysiologisk virkning på sentralnervesystemet, f.eks. anatoksin-a) og polypeptider (sammenkoblede aminosyrer til lange kjeder eller ringer, f.eks. heptapolypeptidet microcystin). Men også andre giftvirkende stoffer - som tilhører ulike kjemiske grupper - blir dannet av blågrønnalger, og er under forskningsmessig behandling. Noen viktige eksempler på blågrønnalgetoksiner omtales i det følgende.

Tabell 5. Oversikt over påviste blågrønnalgetoksiner (Skulberg et al. 1984).

ART	TOKSIN	STOFFGRUPPE
Microcystis aeruginosa (ulike stammer)	microcystin-a (akerstox)	peptid
	microcystin-b	peptid
	microcystin-c	peptid
Anabaena flos-aquae (ulike stammer)	anatoksin-a	alkaloid
	anatoksin-b	ukjent
	anatoksin-c	peptid
	anatoksin-d	ukjent
	anatoksin-a(S)	ukjent
Aphanizomenon flos-aquae (ulike stammer)	aphantoksin	alkaloid
	saxitoksin	alkaloid
Nodularia spumigena	nodularia-toksin	ukjent
Lyngbya majuscula	lyngbya-toksin-a	alkaloid
	debromoaplysiatoksin	fenolforbindelser
Oscillatoria agardhii	oscillatoria-toksin	ukjent
Oscillatoria agardhii var. isothrix	oscillatoria- toksin	ukjent
Schizothrix calcicola	debromoaplysiatoksin	fenolforbindelser
Oscillatoria nigroviridis	oscillatoksin-a	fenolforbindelser
Oscillatoria rubescens	oscillatoria-toksin	ukjent

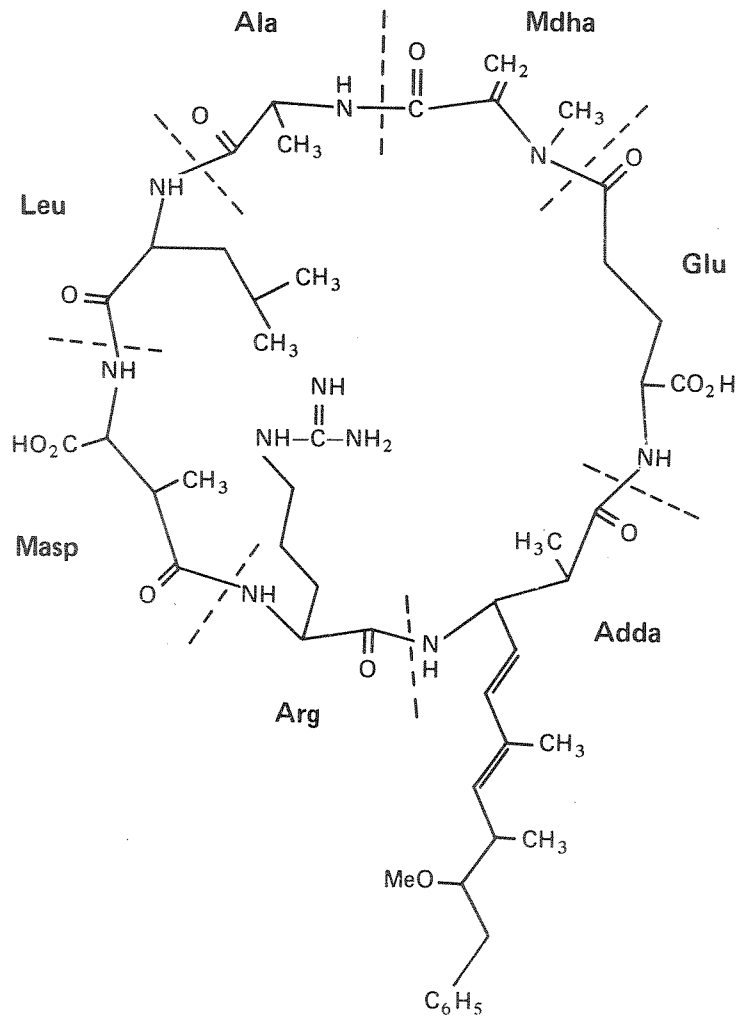
### Toksiner av peptidnatur

Det er særlig toksinene produsert av organismer i blågrønnalgeslekten Microcystis som globalt har laget omfattende forgiftninger og praktiske problemer. Et betydelig forskningsarbeid er utført for å klarlegge de aktuelle stoffene og deres virkninger. Med en samlebetegnelse kalles disse toksinene microcystiner. Under normale betingelser finnes toksinene lokalisert inne i cellene av de giftproduserende stammer av blågrønnalger. Stoffene blir frigitt til det omgivende miljø når celler skades - mekanisk, ved nedbryting av cellevegg, eller når cellen dør (lysis).

Den eksakte oppbygning og molekylstruktur til de forskjellige microcystiner er fortsatt under vitenskapelig bearbeiding. Toksinene varierer noe med hensyn til sammensetning og egenskaper avhengig av art og stamme som produserer stoffene. Ved hydrolyse kan det konstateres at de inneholder fem aminosyrer og metylamin i tilnærmet ekvimolare mengder. Basert på variasjoner i aminosyremønsteret, er det nå beskrevet åtte ulike typer av microcystiner. Molekylvekten til stoffene varierer i området 909-1044 dalton.

Med bakgrunn i forekomsten av giftig Microcystis aeruginosa i Akersvatnet i Vestfold (NIVA 1986 a) ble det foretatt en kjemisk karakterisering av den toksiske faktor (Krishnamurthy et al. 1986, Berg et al. 1986). Det er gjort aminosyrebestemmelser, og bruk av hurtig atomfraksjonering i massespektrometri til formålet. Toksinet - som betegnes akerstox (microcystin-a) - er et syklisk heptapeptid med molekylvekt 994 dalton (Figur 11). Biologisk aktive peptider har gjerne uvanlige optiske konfigurasjoner. Noen av aminosyrene foreligger f.eks. i D- istedenfor i L-form. Dette gjelder også for akerstox (microcystin-a) som har så vel uvanlige som metylerte aminosyrer. Dette forhold har betydning for stoffets spesielle biologiske virkninger (toksistet).

Blågrønnalgen Nodularia spumigena lever i brakkvann og saltvann. Den har vært årsak til forgiftninger i flere geografiske områder av verden. I Østersjøen er det vanlig med vannblomst av denne arten (Hübel and Hübel 1980). Også i norske kystfarvann - spesielt de som grenser til Skagerak - har det i enkelte år vært forekomster av Nodularia spumigena. Toksinet er nylig blitt kjemisk karakterisert (Munro 1987, pers.med.). Det viste seg å være et stoff nær beslektet med microcystin. I figur 12 er den foreslåtte molekylstruktur angitt.

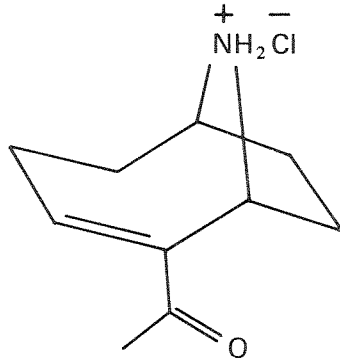


- Arg — arginin  
 Masp —  $\beta$ -metylasparginsyre  
 Leu — leucin  
 Ala — alanin  
 Mdha — metyldehydroalanin  
 Glu — glutamat  
 Adda —  $\beta$ -aminsyrerest av 3-amino-9 metoxy-  
 2,6,8-trimetyl-10-fenyldeka 4,6-dienolsyre

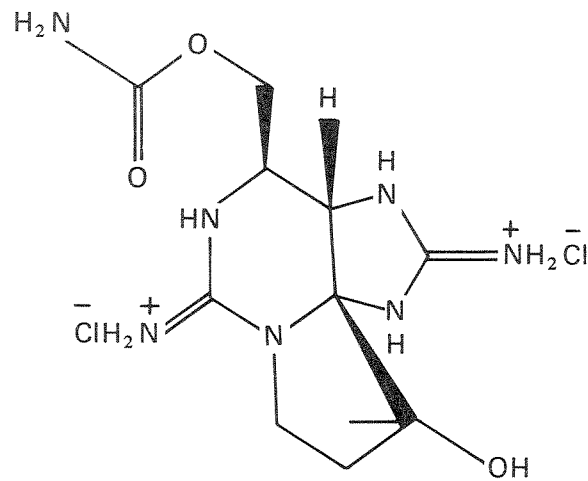
Figur 11. Microcystin-a (akerstox).

Toksin isolert og karakterisert fra Microcystis aeruginosa i Akersvatnet, Vestfold.



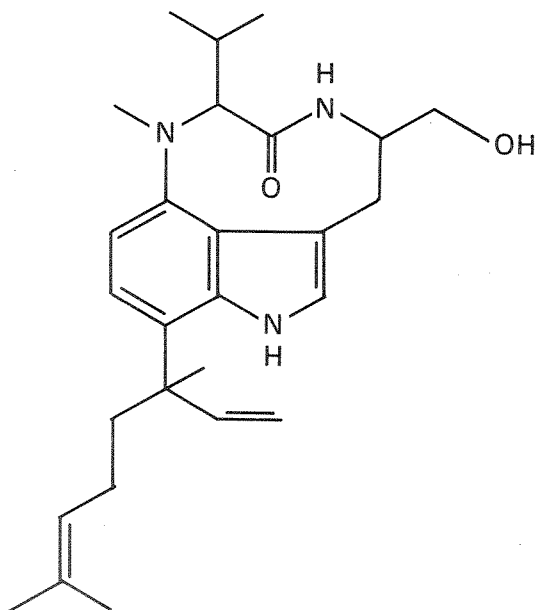


Figur 13. Molekylstruktur av toksin isolert fra Anabaena flos-aquae, anatoksin-a.

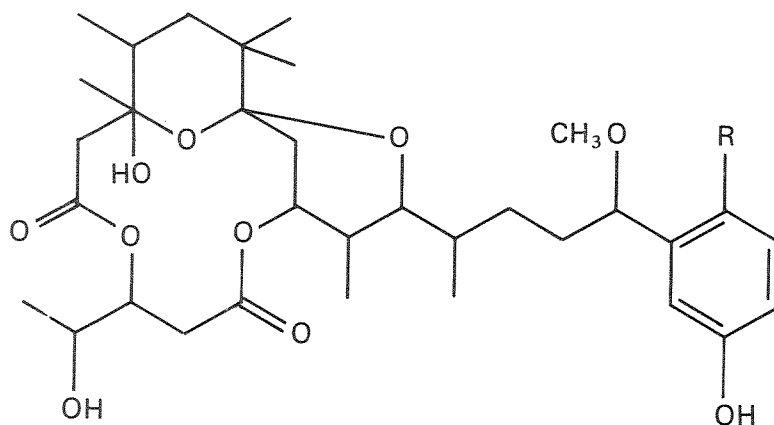


Figur 14. Molekylstruktur av toksin isolert fra Aphanizomenon flos-aquae, aphantoksin (saxitoksin).

De fleste blågrønnalgetoksiner av alkaloid-natur er nevrotoksisk virkende stoffer. Men de kan også ha andre fysiologiske effekter. Som eksempel kan lyngbyatoksin-a nevnes. Det produseres av Lyngbya majuscula og har utpreget dermatotoksisk virkning. Kjemiske undersøkelser (Cardellina et al. 1979) har vist at toksinet er et indol-alkaloid. Molekylstrukturen til toksinet er vist i figur 15.



Figur 15. Molekylstruktur av toksin isolert fra Lyngbya majuscula, lyngbya-toksin-a.



Figur 16. Molekylstruktur av toksin isolert fra Schizothrix calcicola, debromoplysiatoksin.



## Toksiner av fenolnatur

Noen marine arter av blågrønnalger (Lyngbya majuscula, Oscillatoria nigroviridis, Schizothrix calcicola) er kjent for å danne giftstoffer med hudirriterende og tumorfremkallende egenskaper (Moore 1984). Den best undersøkte forbindelse i denne stoffgruppe er debromoaplysiatoksin, et fenolisk bislacton med molekylstruktur som vist i Figur 16.

## GIFTVIRKNINGER OG GIFTIGHET

Biotoksiner dannet av blågrønnalger hører til de mest giftige forbindelser som opptrer i naturen. I Tabell 6 er det gjort en sammenlikning av giftighet til noen kjente naturstoffer. Det er stor variasjon i konsentrasjonen av kjemiske forbindelser med hensyn til helseskadelige virkninger. Det er laget en praktisk skala for bedømmelse av stoffers giftighet (Loomis 1978). Stoffer som virker giftige i konsentrasjoner mindre enn 1 mg pr. kg kroppsvekt betegnes ekstremt giftige. Blågrønnalgetoksinene hører til i denne kategori. Det er nødvendig å understreke at verdiene som er oppgitt for giftighet i tabell 6 bare kan brukes som relative, orienterende størrelser. Det er mange omstendigheter - bl.a. metodikk, forsøksdyr - som vanskeliggjør en bestemmelse av direkte sammenliknbare verdier for giftighet av ulike toksiner.

Tabell 6. Sammenlikning av giftighet til et utvalg av biotoksiner (modifisert etter Mosher et al. 1964 og Gentile 1971).

TOKSIN	DØDELIG DOSE	TOKSINPRODUSERENDE ORGANISMER	KJEMISK FORBINDELSE / STOFFGRUPPE	MOLEKYL-VEKT	REFERANSE
Praktisk betegnelse	LD <sub>50</sub> <sup>-1</sup> µg · kg <sup>-1</sup> kroppsvekt	Art		Dalton	
Botulinus toksin a	0.00003	Clostridium botulinum	Protein	900.000	Gentile 1971
Tetanus toksin	0.0001	Clostridium tetani	Protein	100.000	Gentile 1971
Ricin	0.02	Ricinus communis	Protein	60.000	Gentile 1971
Difteritoksin	0.3	Corynebacterium diptheriae	Protein	72.000	Gentile 1971
Kokoi-toksin	2.7	Phyllobates bicolor	-	400	Gentile 1971
Tetrodotoksin	8	Sphoeroides rubripes	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	319	Gentile 1971
Saxitoksin *	9	Aphanizomenon flos-aquae	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> · 2HCl	372	Carmichael 1986
Kobratoksin	20	Naja naja	Protein	-	Gentile 1971
Microcystin-a *	50	Microcystis aeruginosa	Heptapeptid	994	Berg et al. 1986
Anatoksin-a *	200	Anabaena flos-aquae	Alkaloid	300	Carmichael 1986
Kurare	500	Chondodendron tomentosum	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> · 2	696	Gentile 1971
Stryknin	500	Strychnos nux-vomica	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	334	Gentile 1971
Amatoksin	600	Amanita phalloides	Cyclopeptid	990	Wieland 1986
Muscarin	1100	Amanita muscaria	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NCl	210	Gentile 1971
Phallotoksin	1800	Amanita phalloides	Cyclopeptid	862	Wieland 1986
Glenodin-toksin	2500	Peridinium polonicum	Alkaloid	-	Gentile 1971
Nervegass	3000	(Syntetisk fremstilt)	(C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> F	184	Gentile 1971
Natriumcyanid	10000	(Syntetisk fremstilt)	NaCN	49	Gentile 1971

\* Blågrønnalgetoksin

- ikke kjent

Etter de fysiologiske virkninger blågrønnalgetoksinene har i toksikologisk sammenheng - bl.a. forgiftningssymptomer - kan de deles inn i tre hovedkategorier:

- Nevrotoksiner. Toksinet virker inn på nerveceller og nervefunksjoner
- Hepatotoksiner. Toksinet virker inn på leverceller og leverfunksjoner
- Dermatotoksiner. Toksinet virker inn på hudceller og hudfunksjoner

I det følgende beskrives noen eksempler på hvordan giftvirkningene arter seg.

### Nevrotoksiner

Det er spesielt blågrønnalgetoksinene av alkaloid-natur som hører til denne kategori. De produseres bl.a. av Anabaena flos-aquae og Aphanizomenon flos-aquae. Stoffene paralyserer de perifere skjelettmusklene og respirasjonsmusklene. I nervecellenes synapser inntreffer blokkering av nerveimpulsenes overføring, med kramper som følge.

Kort dødstitid for forsøksmus (5-10 minutter etter mottatt dødelig dose) er karakteristisk for de aktuelle nevrotoksiner.

### Forløpet av forgiftning:

Latensperiode	1-2 minutter
Lammelser	(paralyse)
Skjelvinger	(tremor)
Kramper	(konvulsjoner)
Død etter	5-10 minutter

For en nærmere behandling av de toksikologiske forhold, vises det til litteratur (Gentile 1971; Carmichael 1985, 1986).

### Hepatotoksiner

Dette er de best studerte blågrønnalgetoksiner (Carmichael 1986). Stoffene er polypeptider som bl.a. produseres av Microcystis aeruginosa og Oscillatoria agardhii. De fleste rapporterte tilfeller av forgiftninger med blågrønnalger skyldes hepatotoksiner. Toksikologiske studier viser at giftvirkningen er knyttet til ødeleggelse av leverceller (hepatocytter og endotelieceller i leveren). Omfattende blød-

ninger og strukturendringer i leveren observeres (centrilobulær hemorragisk nekrose). Molekylære mekanismer bak stoffenes virkninger er fremdeles ukjent. Under fremskridende forgiftning registreres synkende blodtrykk, oppsvulming av leveren, og frigjøring av leverenzymmer til blodet (se Figur 17, etter Østensvik et al. 1981).

Dødstiden for forsøksmus (1-3 timer etter mottatt dødelig dose) er lengre enn tilsvarende for nevrotoksiner.

#### Forløpet av forgiftning:

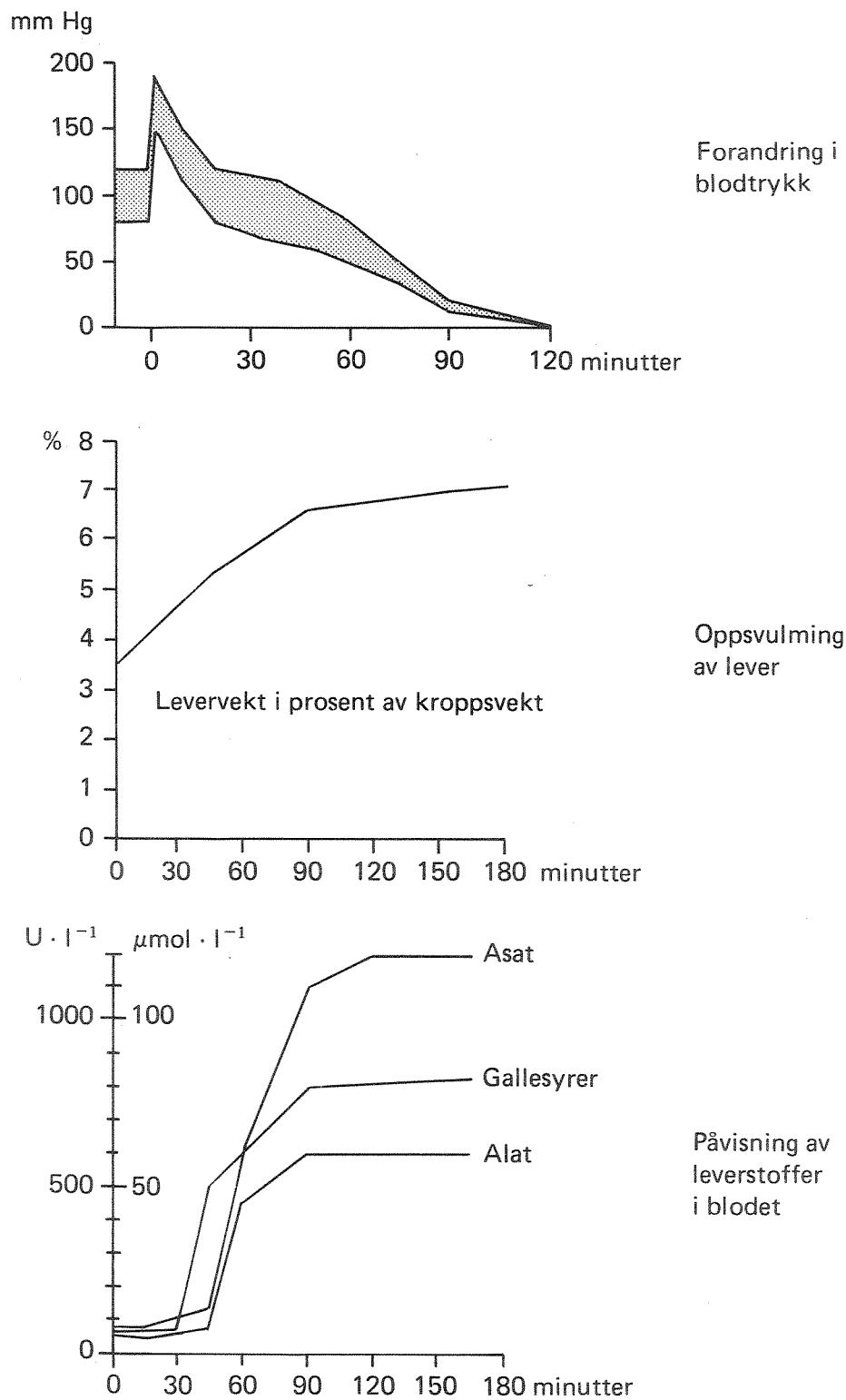
Latensperiode 15-30 minutter  
 Sammensynkning (prostrasjon)  
 Lammelse av bakparten (paralyse)  
 Blekhet - spesielt i ekstremiteter (pallor)  
 Åndedrettsbesvær (dyspnea)  
 Kramper (konvulsjoner)  
 Død inntreffer etter 45-180 minutter.

Det foreligger et betydelig materiale av forskningsresultater som behandler de aktuelle toksikologiske forhold (Runnegar and Falconer 1981, Jackson et al. 1984). Elektronmikroskopiske undersøkelser av leveren til toksinbehandlede mus viser at hepatocytene og de hepatiske endoteliecellene blir skadet. Forandringer i cellenes mitokondrier finner også sted. I preparater av isolerte hepatocytter observeres endringer i cytoplasmaets struktur (ødeleggelse av cytoskjelett, Falconer and Runnegar 1987).

Det er også rapportert effekter på andre organsystemer. Videre kan toksiner av Microcystis forårsake embryonale og gonadotoksiske effekter, i tillegg til rene misdannelser i cellevev (Kirpenko et al. 1981).

#### Dermatotoksiner

Toksinene som inngår i denne kategori er foreløpig lite studert. Men med sine spesielle virkninger tiltrekker de seg betydelig interesse i forskningskretser. Det er særlig de marine artene Lyngbya majuscula og Schizothrix calcicola som hittil er undersøkt med hensyn til sin produksjon av lyngbyatoksin og debromoaplysiatoksin.



Figur 17. Virkninger av microcystin observert på forsøksdyr som har mottatt dødelig dose (Østensvik et al. 1981).

Asat, aspartat-aminotransferase

Alat, alanin-aminotransferase

De aktuelle stoffene (Cardellina et al. 1979) medfører ved hudkontakt alvorlige former for dermatitis ("swimmer's itch"). Symptomene ved forgiftning er hissig rødhet (erythema), fulgt av blemmedannelse og hudavskalling (desquammasjon) i løpet av omlag tolv timer etter eksponering med blågrønnalgen.

Andre effekter av disse stoffene er registrert i cellekulturer fra varmblodige dyr. De har bl.a. tumor-fremkallende egenskaper på tilsvarende måte som stoffer i crotonolje (f.eks. tetradecanolphorbol 13-acetat-TPA). Disse oppdagelsene (Sakamoto et al. 1981) viser at de aktuelle stoffer - foruten å være dermatotoksiner - har egenskaper som setter dem i forbindelse med substanser av cancer-fremkallende natur.

### Lipopolysakkarider (LPS) og allergiske reaksjoner

Stoffene utgjør endotoksiner og består av komplekse forbindelser av lipider og polysakkarider (Jantzen and Bryn 1985, Raziuddin et al. 1983). De er knyttet til blågrønnalgenes cellevegger og virker som antigener. Stoffene kan medføre bl.a. gastroenteritt og febertilstander hos varmblodige dyr.

Undersøkelser av LPS i utvalgte arter av Oscillatoria fra norske lokaliteter er gjennomført. Det viser seg at forbindelsene som dannes av blågrønnalger, tildels er forskjellige fra LPS slik de opptrer hos gram-negative bakterier. De inneholder f.eks. 3-hydroxyfettsyrer, hexosaminer og visse sukkerarter, men ikke 2-keto-3-desoxyoctonsyre (KDO) eller heptose. Videre er 3-hydroxyfettsyrene hos Oscillatoria ikke bestandel av polare lipider, noe som indikerer en annen type LPS sammenliknet med gram-negative bakterier.

Blågrønnalgenes LPS-innhold kan bidra til kontaminering av vann, og er derfor viktig ved vurdering av vannkvalitet i sammenheng med drikkevannsforsyning.

At blågrønnalger kan virke som allergener (stoffer som fremkaller allergi) og dermed forårsake problemer ved bruk av vann, er av betydelig hygienisk interesse (Skulberg 1983). Det er fra gammelt kjent at bading i vann med stor forekomst av blågrønnalger kan gi allergi-liknende symptomer hos sensitive mennesker. Forskningsvirksomhet er utført i flere land, spesielt i geografiske områder hvor forurensning har medført problemer med vannblomstfenomener. I Tsjekkoslovakia er det f.eks. gjennomført inngående undersøkelser av sanitærhygieniske problemer knyttet til vannforekomster med stor utvikling av planteplankton (Štěpánek et al. 1983). Det ble påvist at blågrønnalger var særlig betydningsfulle som problemorganismer. En konklusjon som angår dette kan siteres (p.241):

"On the whole, it can be concluded that on basis of performed tests of human skin irritability, the more sensitive persons being in contact with water blooms (Aphanizomenon especially) can be endangered by their harmful effects. This circumstance should have to be always taken in mind especially if permissions are to be given for recreational bathing on ponds or reservoirs".

## **ØKOLOGISKE FORHOLD**

### **Generelt**

En omfattende litteratur behandler blågrønnalgenes økologiske relasjoner. Det foreligger bl.a. vesentlige kunnskaper om faktorer som gir forutsetninger for masseutvikling av blågrønnalger (Fogg et al. 1973, Whitton 1973).

De enkelte arter varierer mye med hensyn til egenskaper som har konsekvenser for biologisk konkurranse. Faktorer som opptaksevne, lagring av næringskomponenter og vedlikeholdsenergi har slik betydning. Noen blågrønnalger er mer effektive enn andre til å ta opp plantenæringsstoffer ved lave konsentrasjoner. Når det gjelder lagring av næringskomponenter og utnyttelsen av disse igjen, er dette forhold som betyr mye for de aktuelle arter med masseforekomst i innsjøer. Enkelte blågrønnalger synes å ha fysiologiske tilpasninger som muliggjør lav vedlikeholdsenergi for organismen.

Blågrønnalger kan vokse ved til dels lave lysintensiteter. De kan derfor klare seg bra under forhold med grumsete vann, f.eks. når mengden av andre alger er blitt særlig stor. Blågrønnalgene kan ta opp næringsstoffer fra vann med små fosfor- og nitrogenkonsentrasjoner, dette er en fordel f.eks. om ettersommeren når plantenæringsstoffene nærmer seg minimum i vannmassene. Evnen til å lagre fosfor inne i cellene er også et spesielt forhold blågrønnalgene viser (Fogg 1965).

### **Eutrofiering - vannblomst**

Eutrofiering er primært en reaksjon på øket tilførsel til en vannmasse med plantenæringsstoffer som fører med seg øket plantevekst. Algene utgjør den vesentligste andel av primærprodusentene i de fleste akvatiske lokaliteter, og en øket algevekst er gjerne nøye knyttet til utviklingen mot eutrofi.

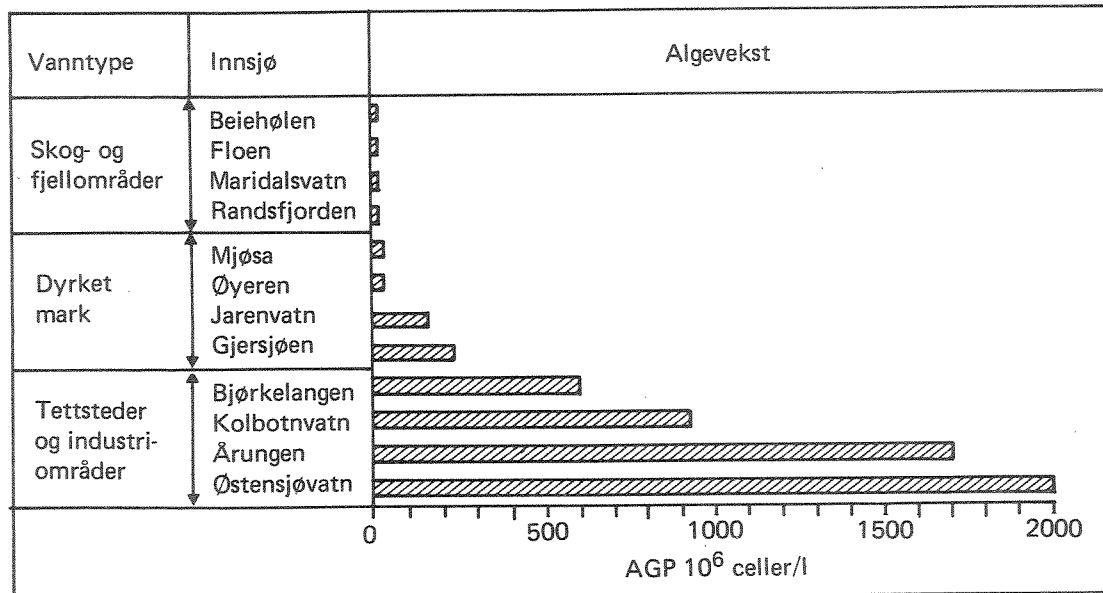
Den uønskede biologiske virkning av eutrofiering er ikke først og fremst større produksjon av alger. Det er særlig forandringene i type algevegetasjon, med bl.a. arter som utvikler vannblomst, som lager problemene. Denne forandringen av algevegetasjon - og da særlig oppblomstringer av blågrønnalger - forstyrrer den normale næringskjede, og resulterer i nye næringskjeder som ofte fører fram til mindre verdifulle sluttprodukter i praktisk sammenheng. Samtidig gjør det seg gjeldende en akkumulering av algemasser på grunn av mindre effektiv nedbeiting og nedbrytning. Råtnende algemateriale, forbruk av vannets oksygeninnhold, dannelse av vond lukt og smak på vann og utvikling av giftige stoffer kan være ledsagende problemer (Skulberg 1981).

Når det gjelder algevegetasjonen, er tilgangen på utnyttbare plantenæringsstoffer en hovedfaktor som bestemmer mengden av algevekst på en lokalitet. Algesamfunnet som utvikler seg vil være avhengig av bl.a. kvalitative og kvantitative sider ved næringsstoffmiljøet. Den totale mengde med algemateriale som dannes, er derimot hovedsakelig bestemt av den tilgjengelige mengde med plantenæringsstoffer (Skulberg 1967). En viktig oppgave ved eutrofieringsstudier er derfor å kunne bedømme hvordan de kjemiske faktorer influerer vannmassene som vekstmedium for alger. Kulturforsøk med alger for å bestemme vannmassenes vekstpotensial (AGP, algal growth potential) er en fruktbar fremgangsmåte (Raschke and Schultz 1987). I Figur 18 er det fremstilt resultater av vekstpotensialmålinger for noen utvalgte norske vannforekomster. Det fremgår at det er stor variasjon i vannmassenes evne til å gi muligheter for algevekst.

For å illustrere den kvalitative betydning av vannet som vekstmedium for blågrønnalger kan Microcystis aeruginosa omtales. Denne arten har et markert fortrinn med ammonium som nitrogenkilde. Nitrat som eneste nitrogenkilde begrenser f.eks. veksthastigheten for Microcystis aeruginosa. Fravær av ammonium i vannet medfører derfor langsommere vekst. Forholdet innebærer at arten da kan bli utkonkurrert av alger med en mer funksjonell nitratmetabolisme under faktorene som råder.

Vannsamlinger som er rike på plantenæringsstoffer viser regelmessig stor forekomst av planktiske alger. Det kan være at disse algene opptrer i så stor mengde at de setter tydelig farge på vannmassen, og dette betegnes med et folkelig uttrykk som "vannblomst". Begrepet "vannblomst" har ingen skarp avgrensning, det er et beskrivende uttrykk for at en sestonfarging (seston, det som lar seg sile fra) av vannet gjør seg gjeldende på en iøynefallende måte. Foruten alger kan også bakterier, invertebrater og andre organismer være årsak til "vannblomst".

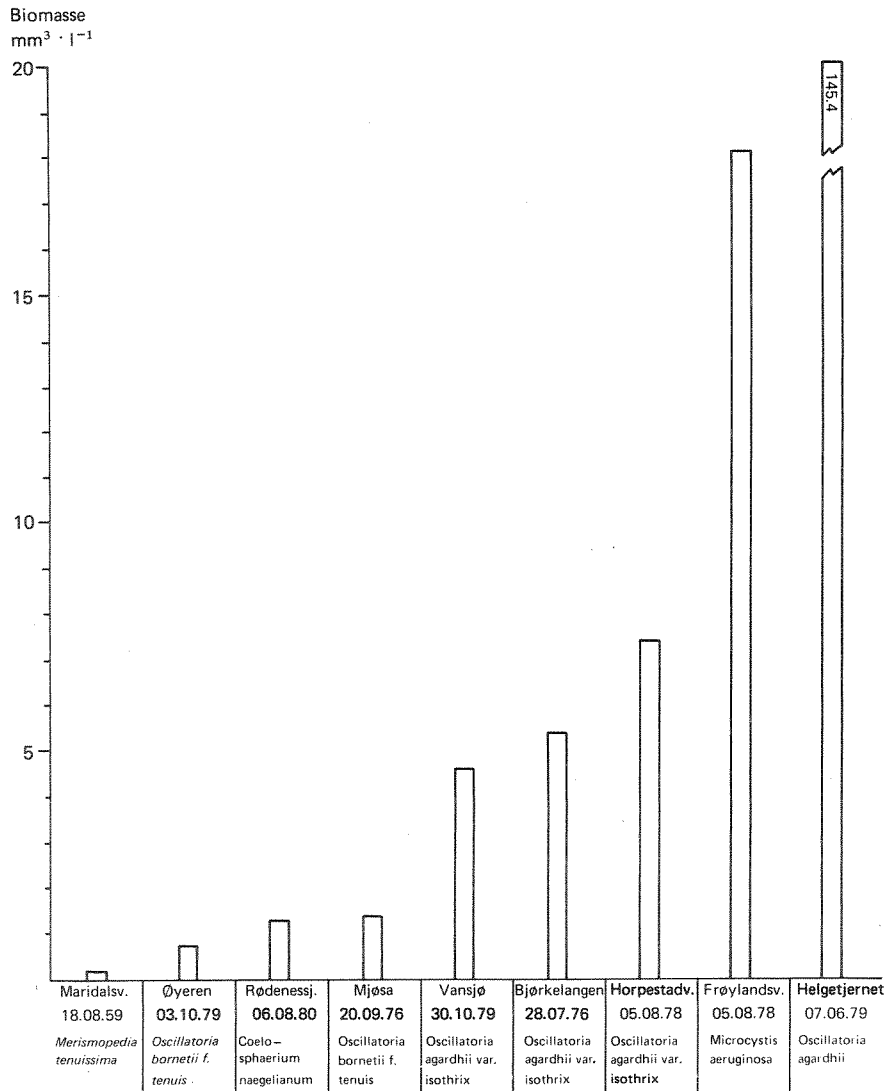




Figur 18. Eksempler på algevekstpotensial i vann fra innsjøer med ulike innhold av næringssalter (Kotai et al. 1978).

Blågrønnalgene viser ofte en utpreget utvikling med dannelse av vannblomst. En spesiell egenskap hos blågrønnalgene gir forutsetninger for dette. Ved hjelp av ulike mekanismer kan de regulere sin spesifikke vekt. Særlig viktig i denne forbindelse er gassvakuolene, organeller i cellene bygd opp av gassvesikler (små gassfylte strukturer), som bl.a. gjør det mulig for planktiske blågrønnalger å innstille seg i vannmassene hvor det er de gunstigste voksebetingelser.

Norske vannforekomster varierer mye med hensyn til vannkvalitet, og de byr ulike muligheter som vekstmedium for alger. Dette kommer til uttrykk i forskjeller i vannmassenes fruktbarhet og produksjonsforhold. Noen eksempler på algekonsentrasjoner under oppblomstringer i norske innsjøer er vist i Figur 19. Volumet av algene (levende biomasse) er bestemt ved mikroskopisk bearbeiding av vannprøver etter sedimenteringsmetoden.



Figur 19. Eksempler på biomasse under algeoppblomstringer (NIVA 1982).

### Utbredelse av giftig vannblomst

De utførte undersøkelser i Norge har vist at giftproduserende stammer av blågrønnalger er forholdsvis vanlige og vidt utbredt (Berg et al. 1986). Som eksempel kan nevnes erfaringene fra Jæren. Av tyve undersøkte innsjølokalteter hadde fjorten innsjøer oppblomstringer med giftproduserende blågrønnalger. Som en foreløpig konklusjon kan det hevdes at i alle vannforekomster hvor det blir masseutvikling av blågrønnalger, er det forholdsvis stor sjanse for at en toksinproduserende stamme kan få dominans (Tabell 7). Tilsvarende forhold er konsta-

Tabell 7. Norske innsjøer hvor det hittil er påvist toksiske blågrønnalger.

FYLKE	INNSJØ	ORGANISMER
Østfold	Vansjø	Oscillatoria agardhii var. isothrix
Akershus	Bjørkelangen Gjersjøen  Holstadvatnet Kolbotnvatnet	Oscillatoria/Anabaena-samfunn Oscillatoria agardhii/rubescens-samfunn Oscillatoria agardhii Oscillatoria agardhii/rubescens-samfunn
Vestfold	Akersvatnet Borrevatnet Goksjø Hillestadvatnet Vikevatnet	Microcystis aeruginosa Microcystis aeruginosa Gomphosphaeria naegeliana Microcystis spp. Microcystis spp.
Buskerud	Steinsfjorden	Oscillatoria agardhii/rubescens-samfunn
Rogaland	Bakkavatnet Breivatnet Bråsteinvatnet Dybingen  Edlandsvatnet Frøylandsvatnet  Hauskevatnet  Horpestadvatnet  Lutsivatnet Limavatnet Mosvatnet Orrevatnet Skartveitvatnet Stokkalandsvatnet Storamos Viksevatnet Vostervatnet	Anabaena flos-aquae Anabaena spp. Anabaena flos-aquae Anabaena flos-aquae Microcystis aeruginosa Anabaena flos-aquae Microcystis aeruginosa Oscillatoria agardhii var. isothrix Oscillatoria agardhii var. isothrix Microcystis aeruginosa Oscillatoria agardhii var. isothrix Microcystis aeruginosa Gomphosphaeria naegeliana Microcystis botrys Diverse blågrønnalger Microcystis aeruginosa Diverse blågrønnalger Anabaena flos-aquae Anabaena flos-aquae Anabaena flos-aquae
Hordaland	Langevatnet	Anabaena flos-aquae
Møre og Romsdal	Hjørungdalsvatnet	Anabaena flos-aquae
Sør-Trøndelag	Haugatjønn	Anabaena flos-aquae
Nordland	Nordmelavatnet	Anabaena flos-aquae

tert i Sverige. I 1985 ble det foretatt en regional undersøkelse for å belyse situasjonen. Prøver ble innsamlet fra 27 innsjøer i ulike deler av landet. Ialt ble 43 prøver analysert for innhold av blågrønnalger og toksiner. For 15 av innsjøenes vedkommende ble det funnet populasjoner med toksinproduserende blågrønnalger. Blågrønnalgetoksiner ble påvist i 53 % av alle de undersøkte prøvene (Mattsson og Willén 1986).

Også i Finland er det gjort undersøkelser som bekrefter at toksinproduserende blågrønnalger er relativt vanlig i plankton. I 1986 ble det f.eks. samlet inn vannblomstmateriale fra 103 lokaliteter med masseutvikling av blågrønnalger. Det viste seg at i 45 av lokalitetene var det toksinproduserende stammer som var dominerende (Sivonen et al. 1986).

En spesiell erfaring av økologisk betydning har fremkommet av de norske undersøkelsene. Det viser seg at tilstedeværelsen av toksinproduserende stammer med blågrønnalger er et vedvarende fenomen i innsjøene det gjelder. Vanlig er det rapportert at vannblomstdannende blågrønnalger med toksinproduksjon bare opptrer periodisk under spesielle, udefinerte sett av miljøfaktorer (Carmichael 1982). I de undersøkte norske lokalitetene med stammer av toksinproduserende blågrønnalger er derimot fenomenet tilsynelatende av kronisk karakter. I Frøylandsvatnet på Jæren har f.eks. alle undersøkte prøver med blågrønnalger siden 1978 vært av toksisk natur. Tilsvarende er funnet i andre innsjølokaliteter med vannblomst av toksiske stammer. Dette innebærer en øket eksponering med toksinene overfor organismene i økosystemet.

### Toksinenes opptreden

Kjemiske og fysiske miljøfaktorers innflytelse på vekst og utvikling av blågrønnalger er inngående studert både under feltbetingelser og i laboratoriesammenheng (Carr et al. 1982).

Det er imidlertid få undersøkelser som har behandlet vekstforhold og påvirkning av toksinproduksjon. Det er beskjeden kunnskap om hva som betinger at populasjoner av blågrønnalger blir giftige. Som tidligere nevnt opptrer enkelte arter blågrønnalger med toksinproduserende stammer. Fra en naturlig vannblomst av en aktuell art er det som regel mulig å isolere stammer såvel med egenskapen toksinproduksjon som stammer uten denne egenskap. Under kulturbetingelser i laboratorium opprettholder en klon av en toksinproduserende art sin giftighet. Men

det er også eksempler på at egenskapen kan gå tapt over tid. Det er foreløpig aldri i noen eksperimentell sammenheng observert at en ikke toksinproduserende klon av blågrønnalger har fått egenskapen å kunne produsere toksin. Mye forskningsarbeid - bl.a. av molykylarbiologisk natur - gjenstår for å avklare disse forhold.

Blågrønnalgetoksinene er beskrevet som eksotoksiner (Carmichael 1981). Men det er ulike opplysninger om i hvilken grad de kan skilles ut fra cellene under aktiv vekst. Da det dreier seg om kanskje 15-20 forskjellige metabolitter av toksinkarakter, vil det være et omfattende arbeid å finne ut av dette.

Som en rettesnor gjelder det at de aktuelle toksiner først og fremst er knyttet til cellene av de aktuelle blågrønnalger. Det er når cellene dør eller celleveggene skades at toksinene kommer ut i vannfasen i nevneverdig grad. Eksperimentelle undersøkelser med Microcystis aeruginosa fra Akersvatnet, Vestfold, har gitt holdepunkter om hvordan forholdene er (Berg et al. 1987a). Vannblomstmateriale under nedbrytning - kontrollerte betingelser - ble fulgt med observasjoner gjennom førti døgn med hensyn til forekomst av akerstox (microcystin-a). I løpet av forsøksperioden ble vannblomstmaterialet (cellene) fullstendig uttømt for toksin, som lekket ut i de frie vannmassene. Her ble toksinet gradvis brutt ned av mikrobiologisk aktivitet. Men ved forsøkets slutt var fortsatt omlag 10% av toksinmengden til stede i vannet.

Blågrønnalgecellene har tildels et høyt innhold av toksiner. Også her kan resultatene for Microcystis aeruginosa fra Akersvatnet i Vestfold være opplysende. I Tabell 8 er det sammenstilt noen data som viser forholdene. Innholdet av toksin var gjennomgående 2 µg akerstox pr. mg frysetørket materiale av blågrønnalger.

Tabell 8. Karakteriserende data for Microcystis aeruginosa Akersvatnet, Vestfold.

Celldiameter  $\sim 3.5-4.0 \mu\text{m}$

Middelvolum  $\sim 28 \mu\text{m}^3$

$35,74 \cdot 10^6$  celler  $\sim 1 \text{mm}^3$

$1 \text{mm}^3$  celler  $\sim 1 \text{mg}$  levende materiale

$1 \text{mg}$  levende materiale  $\sim 0.1 \text{mg}$  frysetørket materiale

$2 \mu\text{g}$  akerstox  $\approx 1 \text{mg}$  frysetørket Microcystis aeruginosa

Molekylvekt: 994 dalton

$\text{LD}_{50} = 50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (intraperitoneal injeksjon på hvite mus)

### Faktorer som påvirker toksinproduksjon

Miljøfaktorenes direkte betydning for blågrønnalgenes evne til å danne toksiner er foreløpig lite studert. Viktige faktorer som det angår er pH, temperatur, lys, konsentrasjoner av næringsstoffer og organismens vekstfase. Da hverken den biokjemiske eller genetiske regulering av de aktuelle fysiologiske prosesser foreløpig er kjent, er eksperimentelle studier vanskeliggjort.

Gjennom kulturforsøk er det fremskaffet noen holdepunkter om vekstbetingelser som gir optimal toksinproduksjon. Disse resultatene er også hovedsakelig knyttet til Microcystis aeruginosa. Toksinproduksjonen er vanlig størst ved ca. 25 °C. Ved lysintensiteter større enn 16 000 lux avtar toksinproduksjonen. Men med de forholdsvis raske variasjoner i toksisitet til vannblomst som er beskrevet (Codd 1984), er det ingen tvil om at det er mange faktorer som er medbestemmende for giftinnholdet i naturlige populasjoner. Det kan vises til eksperimentelle undersøkelser av Microcystis aeruginosa dyrket under ulike lysintensiteter (Watanabe and Oishi 1985). Resultatene indikerte at lysintensiteten var en primær faktor for toksinproduksjonen, i samspill bl.a. med temperatur. Det ble funnet høyere toksisitet i kulturer dyrket ved 18 °C, sammenliknet med tilsvarende dyrket ved 25 °C og 32 °C. Gentile (1971) har vist at temperaturoptimum for toksinproduksjon til Microcystis aeruginosa er omlag 25 °C. Allerede ved 28 °C ble det konstatert 60 % reduksjon i toksinproduksjon (organismens optimumstemperatur for vekst var 32,5 °C).

Betydning av næringsbegrensning for toksinproduksjon til blågrønnalger er belyst i enkelte eksperimentelle undersøkelser (Watanabe and Oishi 1985). Lavere toksininnhold ble funnet i celler dyrket under fosforbegrensende forhold. Det var imidlertid liten forskjell i kulturer dyrket med henholdsvis 5 % eller 10 % av normalmediets fosformengde. Tilsvarende forsøk med nitrogen som begrensende faktor viste at f.eks. 10 % av nitrogenmengden (som nitrat) ga lavere toksinkonsentrasjoner i cellene sammenliknet med utbyttet i normalmediet.

Det foreligger også erfaringer om at de vekstbetingelser som gir optimal produksjon av blågrønnalger, ikke nødvendigvis gir stor produksjon av toksiner (May 1981). Det er f.eks. indikasjoner på at blågrønnalgepopulasjoner under ulike stressbetingelser kanskje er de mest potente med hensyn til giftinnhold.

Nyere undersøkelser (van der Westhuizen et al. 1986) har påvist at både lys og temperatur også har betydning for den relative sammensetning av peptidene i toksinmolekylet. Videre har ulike fysiologiske raser og utviklingsstadium til organismen betydning for toksinproduksjonen, såvel kvalitativt som kvantitativt.

Mye eksperimentelt arbeid gjenstår før full innsikt kan bli oppnådd om miljøfaktorenes innvirkning på blågrønnalgenes toksinproduksjon. Samtidig er det behov for en bedre innsikt om de genetiske forhold knyttet til egenskapene med toksinproduksjon. Det er bl.a. nødvendig å avklare mulig tilstedeværelse av ekstrakromosomalt DNA (plasmider) som eventuelt kan kode for slike egenskaper. Hos flere grupper av mikroorganismer er det f.eks. påvist plasmidbundet toksinproduksjon (van den Hondel et al. 1980).

### Akutt forgiftning

Akutte forgiftninger med blågrønnalger har omfattet en rekke ulike dyrearter (f.eks. kveg, sauer, griser, fugler - tamme og ville -, fisk, hunder, hester, amfibier og invertebrater). Kroniske giftvirkninger og subletale effekter av toksinene er foreløpig praktisk talt ikke studert.

Det er flere forutsetninger som må være oppfylt for at en vannblomst med blågrønnalger skal medføre forgiftningsfare. Blant de viktigste kan nevnes: Oppblomstringen må være med en toksinproduserende blågrønnalge i dominans. Det må finne sted en konsentrering av de toksiske algene i vannmassene (f.eks. med strøm, vindtransport med overflatevann). Toksinene må konsumeres før fortykning eller nedbryting finner sted.

Følgende eksempel vil belyse hvordan en situasjon kan føre til akutte forgiftninger (Skulberg 1979). Ved Frøylandsvatnet, Rogaland omkom i august 1978 en rekke husdyr (kviger) etter å ha drukket vann med vannblomst av Microcystis aeruginosa. I området nær stranda der dyrene hadde tilgang til drikkevann, var vannblomstmaterialet anrikt i vannet i konsentrasjoner av størrelsesorden inntil  $22000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Giftigheten til blågrønnalgene ble bestemt ved hjelp av biotester med mus og var ca.  $2000 \text{ ME} \cdot \text{g}^{-1}$ . Dette innebærer - teoretisk - at en kvige med kroppsvekt 100 kg kan omkomme i forgiftning ved å drikke 0.8 l (dødelig dose) av blågrønnalgesuspensjonen.



Å angi definerte konsentrasjoner av blågrønnalgetoksiner som ut fra helsemessige vurderinger kan være farlig, er imidlertid svært vanskelig. En rekke usikkerhetsmomenter gjør seg gjeldende, bl.a. med hensyn til ulik toksisitet og virkning av forskjellige toksiner, relevans av data fra dyreforsøk og mulige effekter av lav toksintilførsel over lengre tid.

For hepatotoksinet microcystin-a (akerstox) isolert fra Akersvatnet, er  $LD_{50}$  ved intraperitoneal injeksjon på mus 50  $\mu\text{g}$  pr. kg kroppsvekt. Dose-responskurven er svært bratt, og tilførsel av  $1/10 LD_{50}$  gir tilsynelatende ingen toksinvirkning (0-effektnivå).

Forsøk med oral tilførsel av blågrønnalgemateriale fra Akersvatnet til dyr er foreløpig ikke utført. Data fra forsøk der slike toksiners orale og intraperitoneale toksisitet overfor en dyreart sammenliknes, er ikke funnet. Tilgjengelige resultater fra undersøkelser over toksinenes orale toksisitet (forsøksdyr: storfe, småfe, fjørfe) angir en  $LD_{50}$  pr. kg kroppsvekt ved oral tilførsel på  $1/10 - 1/100$  av  $LD_{50}$  pr. kg kroppsvekt ved intraperitoneal injeksjon på mus. Doserresponskurven var svært bratt også i disse forsøkene.

Mangelen på tilstrekkelig grunnlagskunnskap gjør alle beregninger og forsøk på overføringer fra en situasjon til en annen svært usikre. Om det som er nevnt ovenfor f.eks. kunne anvendes direkte på situasjonen i Akersvatnet, skulle det antyde et 0-effektnivå (ingen toksinvirkning) på 50-500  $\mu\text{g}$  pr. kg kroppsvekt ved oral tilførsel av microcystin-a til dyr. Ved ekstrapolering av slike data til mennesker er det vanlig å legge inn en sikkerhetsfaktor på 100 x (10 x for overgang dyr-menneske, 10 x for variasjon i sensitivitet mellom ulike personer) for å beregne kritisk grense for daglig inntak.

Det finnes foreløpig ingen vedtatte grenseverdier for innhold av algetoksiner i internasjonale forskrifter om krav til drikkevann. De aktuelle toksinene (Skulberg et al. 1984) faller imidlertid under gruppen av farlige substanser som det fordres ikke skal være til stede i drikkevann (SIFF 1987, WHO 1984, Holden et al. 1970, 1987).

### Hydrobiologiske innvirkninger

Det foreligger hittil beskjedne kunnskap om hva som betinger at populasjoner av blågrønnalger blir giftige. Likedan er det sparsomt med undersøkelser om virkninger som giftproduserende blågrønnalger har overfor andre komponenter i økosystemet. Til tross for at toksinenes

egenskaper er forholdsvis godt dokumentert for blågrønnalgenes vedkommende, er den økologiske betydning av stoffene vanskelig å vurdere.

Det foreligger flere undersøkelser av allelopatiske virkninger av blågrønnalger overfor andre alger i plankton. Velkjent er eksperimentene hvor celle-fri filtrat av axeniske kulturer med blågrønnalger (bl.a. Oscillatoria, Anabaena og Aphanizomenon) ga tydelig inhiberende virkning på diatoméer (Keating 1977 og 1978). Suksessjon av algearter under vegetasjonsperioden kan muligens være påvirket av slike interaksjoner. Eksperimentelle undersøkelser har også dokumentert klare baktericide virkninger av blågrønnalgemetabolitter (Metting and Pyne 1986).

Det er ofte blitt påvist at blågrønnalger i mindre grad enn andre organismer blir beitet ned av zooplankton, eller av algespisende fiskearter (Golterman 1975). Denne effekt kunne bl.a. ha forbindelse med blågrønnalgenes innhold av toksiner. Men undersøkelser er få som søker å gi bevis for dette forhold.

Enkelte andre eksempler fra undersøkelser kan tas med for å illustrere det foreliggende kunnskapsgrunnlag. Toksisk virkning av Microcystis aeruginosa er vist på dyr som lever i vann (Malyarevskaya et al. 1970). Påvirkning førte til forstyrrelser i enzymaktivitet og biokjemisk syntese hos f.eks. abbor (Perca fluviatilis), slik at fisken døde av mangelsykdom. Konsentrasjoner ned til  $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  med Microcystis aeruginosa var giftig for abbor ved at fiskens thiaminase-aktivitet ble sterkt øket (parallell til Haff-syken). Tilførsel av thiamin på et tidlig stadium i sykdomsforløpet hadde helbredende virkning på fisken.

Vannblomst med Microcystis aeruginosa i dominans er vist å være giftige for karpefisk - cyprinider - (Solomatina et al. 1972). Enzymsystemet for syntese av aminosyrer ble skadet. Det ble påvist inhibering av transamineringsprosessen, den viktigste måten L-aminosyrer blir syntetisert og brutt ned på. Den forgiftede fisken viste store endringer i mengden frie og proteinbundne aminosyrer.

Som nevnt er det mange observasjoner av fravær eller betydelig reduksjon av zooplankton under oppblomstringer med blågrønnalger. Forholdet har vanlig blitt tolket som en effekt av at predatorer (fisk) har beitet ned krepsdyrbestanden. Som en følge av dette har planteplanktonet bl.a. fått gunstige oppvekstbetingelser (Wetzel 1975). Imidlertid kan en slik tilbakegang i zooplankton også tenkes å være tildels forårsaket av allelopatiske virkninger, f.eks. på grunn av giftegenskape-

ne til aktuelle arter av blågrønnalger. Undersøkelser av innvirkning av Microcystis aeruginosa på overlevelsessevnen til zooplankton (Stangenberg 1968) har gitt interessante resultater. Materiale av levende celler med Microcystis hadde ingen negativ effekt på krepsdyret Daphnia longispina, tvert imot økte overlevningsevnen uten innvirkning på reproduksjonsforholdene. Men ekstrakter av frysetørket materiale hadde tydelig toksisk virkning både på Daphnia longispina og Eucypris virens. Tilsvarende resultater ble oppnådd for Daphnia magna (Sirenko et al. 1976). Levende celler av Microcystis var lite toksiske for naturlige zooplanktonpopulasjoner. Toksisiteten tiltok derimot betraktelig under nedbrytning av algekulturen.

Undersøkelser i Lac du Bourget i Frankrike (Michel et al. 1972) viste at Microcystis var toksisk for organismer i bunnfaunaen. Ulike dyregrupper som oligochaeter, ostracoder, chironomider og nematoder viste ulike følsomhet overfor toksinene fra Microcystis.

Problemstillinger knyttet til blågrønnalgetoksinenes muligheter til konsentrering gjennom næringskjeden, er fremdeles lite belyst. En parallellisering med andre biotoksiner tilsier at en slik anrikning sannsynligvis foregår. Det er bl.a. nærliggende å vise til toksiner produsert av dinoflagellater som kan anrikes i muslinger og fisk (WHO 1984, Steidinger 1983; Anderson et al. 1985). Noen eksempler på anrikning av blågrønnalgetoksiner kan nevnes. Lyngbya majuscula er viktig næring for Stylocheilus longicauda (marin gastropode). Debromoaplysiatoksin blir funnet konsentrert i organer, og stoffet har metaboliske funksjoner i dyret (Kato and Scheuer 1975, 1976). Tilsvarende beiter Siganus fuscescens ("rabbitfish") på Lyngbya majuscula. Det er holdepunkter for at anrikning av debromoaplysiatoksin er årsak til epidemisk fiskeforgiftning (ciguatera) blant befolkningen på Ruukyus Islands (Hashimoto et al. 1976). Peptidtoksinet produsert av Oscillatoria agardhii har medført forgiftninger i innsjøer på Ålandsøyene. Stoffet er et relativt stabilt peptid beslektet med microcystin. Ferskvannsmuslingen Anodonta cygnea anriker oscillatoriatoxin fra levende blågrønnalger. Den største toksinkonsentrasjonen ble påvist i hepatopancreas (Eriksson et al. 1988).

Det er altså en rekke holdepunkter for at blågrønnalgene gjennom sin toksinproduksjon har konsekvenser for det øvrige organismeliv i vannforekomstene. Men et fortsatt forskningsarbeid er nødvendig for å avklare virkningsmekanismer og den økologiske betydning av fenomenet.

## **PÅVISNING OG ANALYSERING AV BLÅGRØNNALGETOKSINER**

Undersøkelser av toksinproduserende blågrønnalger omfatter mange metoder (Codd 1984). Det er i første rekke biologiske og kjemiske fremgangsmåter som brukes til påvisning og analysering av de aktuelle stoffer. I det følgende blir det gitt en kort oversikt over noen viktige metoder.

### **Akutte toksisitetstester**

Laboratorium: Institutt for næringsmiddelhygiene, Norges veterinærhøgskole.

Toksiner produsert av blågrønnalger kan påvises ved akutte toksisitetstester på laboratoriedyr. Testmateriale tilføres forsøksdyrene ved en engangsdosering. Under forsøket registreres symptomer og dødsfall blant forsøksdyrene. Etter en intraperitoneal injeksjon (i.p. - innsprøytning i bukhulen) av en dødelig dose av microcystin (toksinet til Microcystis aeruginosa) på hvite mus, registreres f.eks. følgende virkninger:

- Latensperiode uten symptomer på ca. 30 min.
- De første symptomer på forgiftning består av vekslende uro og slapphet. Dyrene blir bleke, noe som best registreres på ørene og halen.
- Senere oppstår det nervøse symptomer i form av lammelser og kloniske kramper, og dyrene får respirasjonsbesvær.
- Døden inntreffer etter ca. 1 time.

Toksisiteten uttrykkes i muse-enheter (ME) pr. gram frysetørket materiale. 1 ME tilsvarer minimum letal dose for en 20 g's mus, i løpet av 4 timer.

### **Kjemiske analyser**

Laboratorium: - Norsk institutt for vannforskning  
- Senter for industriforskning  
- Norges veterinærhøgskole

Kjemisk påvisning av blågrønnalgetoksiner blir utført med høytrykks-væskekromatografi (HPLC). Fremgangsmåten er behandlet i flere publikasjoner (Carmichael 1982, Berg et al. 1987b). I det følgende omtales i noen detalj metodene som benyttes for algemateriale og vannprøver.

Algeprøver. Materialet blir ekstrahert med 20 % metanol + 5 % n-butanol i vann. Ekstraktet renses på Bond-Elut C<sub>18</sub> "reversed phase" kolonner, og behandles i 1000 x 25 mm kolonne fylt<sup>18</sup> med Sephadex G 25 Superfine. Mobilfase er 5 % metanol (1 ml·min<sup>-1</sup>), og eluatet blir samlet opp med fraksjonssamler. Fraksjonenes UV-absorpsjon måles ved 240 nm, og de fraksjonene som danner den første store absorpsjonstoppen blir deretter slått sammen og behandlet på følgende HPLC-system:

Mobilfase	-	26 % acetonitril i 10 mM ammoniumacetat
Kolonne	-	4 x 150 mm Supelcosil LC-18
Pumpe	-	Perkin Elmer Series 10
Detektor	-	Perkin-Elmer Lamda 5 UV-VIS spektrofotometer utstyrt med 8 µl HPLC flowcelle
Bølgelengde	-	240 nm
Flow	-	1,5 ml·min <sup>-1</sup>
Inj.vol.	-	10 µl.

Vannprøver. Etter GF/C-filtrering blir prøvene ekstrahert etter følgende metode:

Først blir prøven (1 l) tilsatt 5 % n-butanol og deretter pumpet gjennom Bond-Elut C<sub>18</sub>-kolonner. Absorbent toksin elueres med metanol. Vannprøven, som passerer gjennom Bond-Elut C<sub>18</sub>-kolonner, blir inndampet til tørrhet i Rotavapor. Tørrstoffet blir<sup>18</sup> deretter ekstrahert på samme måte som for frysetørket algemateriale. De to ekstraktene opparbeides som nevnt ovenfor for HPLC-undersøkelse.

For praktiske formål under feltbetingelser kan en fremgangsmåte for prøvetaking og analysering som nevnt nedenfor være hensiktsmessig. Det kjemiske analyseverktøy med bruk av høytrykksvæskekromatografi (HPLC) er fortsatt nødvendig hjelpemiddel.

- |  |  |
|--|--|
| - Vannprøve med blågrønnalger innsamles på lokaliteten. Vannvolum 1 l.                                     | ↑<br>Utføres ved prøvetaking i felt<br>↓ |
| - Filterpatroner (Sep. Pak. C <sub>18</sub> ) benyttes til anrikning av mulig tilstedeværende microcystin. |  |

- Filterpatronene elueres med metanol.
- Uttrekket inndampes i nitrogenatmosfære.
- Ekstraktet veies.
- Ekstraktet analyseres ved hjelp av høytrykksvæskerkromatografi (HPLC).
- Analytisk C<sub>18</sub> kolonne. 10 mM ammoniumacetat i 26 % acetonitril. 254 UV detektor.

Utføres  
ved be-  
handling  
i labo-  
ratoriet

### Noen enheter og definisjoner

Toksinkonsentrasjon angis vanlig som µg pr. liter. For blågrønnalger i vannblomst er det hensiktsmessig å referere til mengde toksin i frysetørket prøve av den aktuelle art. Noen anvendte enheter ved bestemmelse av giftighet kan presiseres.

MLD = Minimum letal dose, minste mengde av et stoff pr. kg kroppsvekt, som er dødelig for mus, etter en bestemt tid ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  mus).

LD<sub>50</sub> = Letal dose 50, mengde av et stoff pr. kg kroppsvekt, som er dødelig for 50 % av behandlede mus, etter en bestemt tid ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  mus).

LD<sub>100</sub> = Letal dose 100, mengde av et stoff pr. kg kroppsvekt, som er dødelig for 100 % av behandlede mus, etter en bestemt tid ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  mus).

M.E. = Muse-enhet, minste mengde av et stoff, som er dødelig for en 20 g's mus etter en bestemt tid ( $\mu\text{g}\cdot 20\text{ g}^{-1}$  mus).

Som eksempel på bruk av disse angivelser kan resultater fra Akersvatnet, Vestfold, nevnes:

Giftproduserende alge, Microcystis aeruginosa.

Toksin, microcystin-a (akerstox).

LD<sub>50</sub> ≈ 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (biotest med mus)

MLD<sub>50</sub> ≈ 50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (biotest med mus)

M.E. ≈ 1  $\mu\text{g}\cdot 20\text{ g}^{-1}$  (mus)

## GENERELL DRØFTELSE

Det er eutrofiering (forurensning med plantenæringsstoffer) som lager forutsetninger for masseutvikling av blågrønnalger, og dermed gir risiko for situasjoner med giftproduksjon. Når problemer med toksiske blågrønnalger nå melder seg i økende omfang her i landet, er det flere forhold som har betinget dette. Noen skal nevnes. Eutrofiering av vannforekomster er raskt tiltakende. Mange eutrofe lokaliteter brukes til vannforsyning for mennesker og husdyr, rekreasjon, akvakultur osv., og de praktiske problemer med dårlig vannkvalitet gjør seg stadig mer gjeldende. Kunnskapen om at blågrønnalgene kan være giftproduserende, har ført til økt oppmerksomhet mot fenomenet oppblomstringer av blågrønnalger. Men til dette kommer dessuten en mulighet for at giftproduserende blågrønnalger aktivt blir begunstiget i den utvikling som finner sted (vekstfaktorer, spredningssjanser). Forholdet kan sammenholdes med en liknende tendens til større forekomst av toksindannende dinoflagellater i nord-europeiske farvann som er registrert av marin-biologer de seinere år (Tangen 1984).

Med bakgrunn i innsikten om eutrofieringstilstanden i Norge, er det mulig å antyde noe om utbredelsen av fenomenet med utvikling av giftproduserende blågrønnalger i praktisk sammenheng. I alle landets fylker er det innsjøer hvor vannblomst med blågrønnalger er et regelmessig problem. Det gjelder særlig vannforekomster som mottar stor belastning av plantenæringsstoffer gjennom kloakkvannsutslipp, eller avrenningsvann fra husdyrhold og jordbruksvirksomhet. De geografiske områder i Norge med stor befolkningstetthet og intensivt landbruk vil derfor samtidig ha vannforekomstene hvor masseutvikling med giftproduserende blågrønnalger kan gjøre seg gjeldende. Beliggenhet i forhold til nordlig bredde eller høyde over havet er trolig av mer underordnet betydning. Fortsatte regionale undersøkelser kan avklare den reelle situasjon.

Masseutvikling av blågrønnalger i en vannforekomst vil i seg selv gi betydelige praktiske ulemper. Algebiomassen vil bl.a. være direkte og indirekte til hindring for mange bruksinteresser. Den livsutfoldelse organismene utøver under en masseoppblomstring vil dessuten medføre en rekke med kjemiske innvirkninger på vannkvaliteten. Det dreier seg om stoffer som dannes ved blågrønnalgernes metabolisme. I denne sammenheng står f.eks. lukt- smaksstoffer og toksiner som blågrønnalger kan produsere.

Blågrønnalgetoksinene har virkninger på andre organismer i samfunnet hvor blågrønnalgene utvikler seg (allelopati). Foreløpig er disse virkninger lite studert. Det er imidlertid påvist at en rekke vannorganismer er ømfintlige for de aktuelle stoffer. Organismer som dette omfatter er bl.a. bakterier, alger, invertebrater og fisk. Varmblodige dyr er dessuten utsatt for forgiftninger av blågrønnalger (fugl, pattedyr).

Det er grunn til å anta at utviklingen av toksinproduserende blågrønnalger kan ha avgjørende virkninger for hele næringskjeden i aktuelle lokaliteter. I situasjoner med dominans av blågrønnalger (f.eks. vannblomst), kan blågrønnalgene påvirke konkurransen mellom organismene gjennom utskilling av flere kjemiske forbindelser (Fogg et al. 1973).

Algeoppblomstringer i vannforsyninger kan gi hygieniske ulemper og medføre problemer for den tekniske behandling av vannet. Ytterligere problemer melder seg hvis blågrønnalger med toksindannelse har stor forekomst i drikkevannskilder. Såvel mennesker som dyr kan da under uheldige omstendigheter bli utsatt for forgiftninger. Den vanlige rensetekniske behandling av drikkevann - koagulering, filtrering og klorering - er ikke tilstrekkelig til å fjerne alge-toksiner fra vannet (Haugan et al. 1982).

Den rekreasjonsmessige bruk av vann er omfattende. Trolig er det i slik sammenheng flest mennesker kommer i kontakt med oppblomstringer av toksinproduserende blågrønnalger. Både i forbindelse med bading, og ved matlaging kan det være muligheter til stede for å få i seg blågrønnalger og deres toksiner. En rekke symptomer som kan følge slik påvirkning, er rapportert (f.eks. kvalme, oppkast, magesyke, hudutslett, øyeirritasjoner). De viser tre generelle kliniske forhold: gastrointestinale forstyrrelser, organallergiske- og lokalallergiske reaksjoner. I Norge er det foreløpig for få holdepunkter til å bedømme denne helsemessige side ved oppblomstringer av blågrønnalger.

Det er i løpet av de seinere år i enkelte land tatt i bruk industriell produksjon av blågrønnalger til mat for mennesker og fôr til dyr. Denne produksjon er foreløpig i liten grad gjenstand for kontroll når det gjelder mulighet for utvikling av giftige stammer. I Norge er det særlig som helsekost at blågrønnalger benyttes av mennesker. I utviklingsland er det imidlertid rask økende interesse for utnyttelse av blågrønnalgens høye proteininnhold. Det blir f.eks. tilrettelagt for å utnytte lokale, nye kulturmuligheter til produksjon av blågrønnalger for høsting til mat (f.eks. i India). Dette innebærer en mulig risiko for at mennesker kan bli forgiftet med algetoksiner.



Spørsmålet om hvordan blågrønnalgetoksiner eventuelt kan anrikes i fisk og andre næringsmidler produsert i vann, er lite undersøkt. Det er i mange geografiske områder kjent at fisk kan bli uspiselig - ubrukelig som mat - på grunn av toksininnhold (ciguatera). I særlig grad synes dette forhold å være knyttet til dinoflagellat-toksiner. De aktuelle stoffene er kjemisk til dels av samme natur som blågrønnalgetoksiner. Det er derfor grunn til å få undersøkt om liknende forhold med mulig anrikning av toksiner i næringskjeder også kan gjelde for blågrønnalgetoksiner.

Selv om kjennskapet til giftproduserende alger er gammel, er utforskningen av fenomenet og organismene det dreier seg om av ganske ny dato. Dette gjelder også blågrønnalgene. Det forhold at blågrønnalgene er prokaryoter, gjør dessuten at de nå har en spesiell interesse i forskning knyttet til bioteknologi.

Giftvirkningene til blågrønnalgetoksinene omfatter flere kategorier av reaksjonsmekanismer. Utforskningen av disse vil gi vesentlig kunnskap som har betydning for både klinisk toksikologi og miljøtoksikologi. Såvel akutte som kroniske giftvirkninger trenger oppmerksomhet. Opptak og fordeling av de aktuelle toksiner i organismen er fremdeles lite kjent. I denne sammenheng står bl.a. problemene knyttet til passasje gjennom cellemembraner. Faktorer som påvirker giftigheten, og hvordan stoffene brytes ned eller avgiftes i organismen, er eksempler på viktige forskningsoppgaver.

Hvordan stoffene produseres av blågrønnalgene er ukjent. De biokjemiske reaksjoner som fører frem til disse spesielle metabolitter, er sentrale forskningsoppgaver (se Figur 20). Av praktisk interesse er forståelsen av hva som betinger stort innhold av toksiner i blågrønnalgene. Flere ytre vekstfaktorer blir undersøkt i denne forbindelse (lys, temperatur, næringsstoffer osv.).

Det er et lite antall arter av blågrønnalger som er kjent for å være toksinproduserende. Disse artene opptrer med stammer (fysiologiske varianter) som kan ha toksinproduksjon, eller mangle denne egenskapen. Den genetiske kontrollen av toksinproduksjonen i blågrønnalgene er ikke kjent. Plasmider har blitt påvist i flere arter blågrønnalger. Da plasmider er kjent for å være knyttet til giftdannelse hos enkelte bakterier, er dette et forhold som også trenger oppmerksomhet for blågrønnalgens vedkommende. De eksperimentelle muligheter for å undersøke dette ligger godt til rette (Westgaard 1987).

Betydelige forskningsoppgaver er knyttet til hvordan blågrønnalgetoksinene påvirker andre organismer i samfunnene de inngår (akvatiske og terrestriske lokaliteter). De toksinene som hittil har fått oppmerksomhet, er tilsynelatende typisk artsspesifikke i sine virkninger (allelopati).

Betingelsene for at giftige populasjoner utvikler seg, er under utforskning. Likedan gjelder det omstendighetene som fører frem til at aktuelle forgiftninger manifesterer seg. Spørsmålsstillinger knyttet til anrikning og nedbrytning av toksiner under naturlige forhold inngår i dette. Det er bl.a. behov for å klarlegge dose - responsproblemet i praktisk og hygienisk sammenheng. Kunnskap fra den økologiske utforskning av fenomenet vil gi vesentlige holdepunkter for tiltak som kan gjøres for å unngå ulemper med masseutvikling av giftproduserende blågrønnalger.

Blågrønnalgetoksinene representerer også en innfallsport til vesentlig farmakologisk viten. Stoffene har f.eks. interesse innenfor humanmedisinsk og veterinærmedisinsk forskning. Det er neppe tilfeldig at aktiviteten på området internasjonalt i tildels stor grad er finansiert av midler forbundet med militær forskning (USA, USSR). Produksjon av stoffene, og anvendelsesmulighetene de har, kan utvikle seg til et stort virksomhetsområde. Dette tegner bl.a. et perspektiv for bioteknologi i en praktisk forlengelse av den mer grunnleggende og anvendte forskningsinnsats om giftproduserende blågrønnalger.

#### **PRAKTISK VURDERING OG FOREBYGGENDE TILTAK**

Regionalt er blågrønnalgeoppblomstringer mest utbredt på Østlandet, Sørvestlandet og i Trøndelag, men kan utvikles i alle landsdeler med eutrofe vannforekomster. Utover sommeren - gjerne i perioder med varmt og tørt vær - kan det bli stor produksjon av blågrønnalger. I perioder vil algemassen samles i overflaten (vannblomst), og transporteres med vind, strøm og bølger. Det vil gjerne finne sted oppkonsentrering av blågrønnalger langs strender, i vikene og bukter, ofte i vegetasjonsbelter av høyere planter. Konsentrasjonen av blågrønnalger vil variere mye med lokalitet og tid, raskt skiftende forhold er typisk for vannblomstfenomener.

Akutt forgiftningsfare med blågrønnalgetoksiner er knyttet til opptak av vann som inneholder giftige blågrønnalger eller direkte fritt toksin i vannmassene. Forgiftninger av dyr (husdyr og dyr i ville populasjoner) har blitt beskrevet siden slutten av forrige århundre. Når husdyr har tilgang til rent drikkevann, synes de å ville unngå vann med blågrønnalgeoppblomstringer. Faren for forgiftning er størst når dyra går på store beiteområder uten fast tilsyn. Masseutvikling av toksinproduserende blågrønnalger er sterkt uønsket i sammenheng med akvakultur. Det kan gi opphav til problemer i oppdrettsanlegg for fisk (mistrivsel, helseskade). Selv om det skal store algekonsentrasjoner til for eventuelt å drepe fisken, er langtidseffekter knyttet til kroniske lidelser og forringelse av kjøttkvalitet fryktet (Phillips et al. 1985).

Når det gjelder forgiftningsfare for mennesker, er dette knyttet til drikkevann og rekreasjonsmessig bruk av vann (WHO 1984). Direkte dødsfall av mennesker synes ikke å være påvist. Ved daglig inntak av vann fra drikkevannsforsyning med toksinpåvirket vann, ble det etter få måneder konstatert leverskader hos befolkningen som brukte vannet (Falconer et al. 1983, Hawkins et al. 1985). Blodplasmaet viste f.eks. økt mengde av leverenzymene, spesielt gamma-glutamintransferase (GGT) og alanin-aminotransferase (ALAT).

Episoder med sykdom - særlig mage-tarmbesvær - i områder med blågrønnalgeholdige drikkevannskilder er imidlertid rapportert fra mange geografiske områder. Størst risiko er forbundet med bruk av grunne, eutrofe vannforekomster som råvannskilde. De vanlige behandlingsmetoder for rensing av drikkevann, gir ikke en tilstrekkelig sikring mot algetoksiner i drikkevannet.

Vannforekomster med masseutvikling av blågrønnalger bør unngås som råvannskilde for vannverk og til vanningsformål til dyr. Må de brukes, trengs en regelmessig overvåking og undersøkelse av mulig utvikling av toksinproduserende stammer av blågrønnalger. Påvises toksinproduserende blågrønnalger eller deres toksiner, bør vannforekomsten tas ut av slik bruk. Det kan være nødvendig med avsperring (f.eks. gjerde for husdyr), og bruk av alternative vannotførsler. Brukerne av vannforekomsten må informeres om faremomentene. Dette kan gjøres gjennom massedia, ved oppslag og andre fremgangsmåter. For drikkevannsbehandling kan aktivkarbon være en praktisk mulighet til å fjerne en stor del av blågrønnalgetoksin i vannet. Preventive tiltak i vannforekomsten omfatter kjemisk behandling av lokaliteten (NIVA 1986b).

Det er helsemyndighetene ved de lokale helseråd som er den faglige instans for vurdering av helsefare og tilretteleggelse av eventuelle praktiske tiltak i forbindelse med oppblomstringer av toksinproduserende blågrønnalger (SIFF 1987).

#### TOKSINPRODUSERENDE BLÅGRØNNALGER. NORSKE RAPPORTER OG PUBLIKASJONER

\*

Skulberg, O.M. (1956): Vannblomst av blågrønne alger som årsak til forgiftning av dyr og mennesker. Fauna 9 (1): 19-26.

\*

Skulberg, O.M. (1972): Blågrønnalger i norske vannforekomster, mulige konsekvenser av sunnhetsmessig betydning for mennesker og dyr. Tidsskr. norske Lægeforen. 92 (12): 851-854. English summary.

\*

Nygård, J.J. (1977): Toksiske blågrønnalger i ferskvann. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1976, Oslo, pp. 17-24.

\*

Skulberg, O.M. (1979): Første tilfelle av Microcystis-forgiftning registrert i Norge. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1978. Oslo, pp. 73-77.

Skulberg, O.M. (1979): Giftvirkninger av blågrønnalger - første tilfelle av Microcystis-forgiftning registrert i Norge. Toxic effects of blue-green algae - first case of Microcystis-poisoning reported from Norway. Temarapport 4, Norsk institutt for vannforskning, Oslo. English summary.

Underdal, B., Skulberg, O.M. og Østensvik, Ø. (1979): Problemer med masseforekomst av blågrønnalger - nye tilfeller sommeren 1979? Norsk Veterinærtidsskrift, nr. 6, 375-377.

Sleire, B. (1980): Oppblomstringer av alger og cyanobakterier. Innvirkning på drikkevann. Rapport Statens institutt for folkehelse. 149 pp.

\*

Østensvik, Ø., Skulberg, O.M. and Søli, N.E. (1981): Toxicity studies with blue-green algae from Norwegian inland waters. In: The Water Environment: Algal Toxins and Health, Ed. W.W. Carmichael, Plenum Press, New York. pp. 315-324.

\*

Haugan, B.E., Skulberg, O.M. og Underdal, B. (1982): Giftige alger i drikkevannsforsyninger. - Noen holdepunkter om praktiske tiltak. NIVA-rapport 0-81094, 10. mai 1982. 26 pp.

Underdal, B. og Skulberg, O.M. (1982): Giftproduserende blågrønnalger i vannblomst. SFT årsrapport 1982. TA-588, 87-92.

\*

Haaland, M., Solberg, I.M. og Øverås, J. (1983): Forgiftning av sau og storfe med blågrønnalger. Norsk Veterinærtidsskrift, nr. 3, 171-173.

Norsk institutt for vannforskning (1983): Vannblomst med giftige blågrønnalger - undersøkelser i Rogaland 1982. Oversikt. Resultater. Erfaringer. Rapport 0-82087, F-83462, 18. mai 1983. 42 pp.

\*

Dahl, E. (1984): Two occasions of mass occurrence of *Nodularia spumigena* along the southern coast of Norway. Abstract. Statens biologiske stasjon, Flødeviken, Arendal.

Skulberg, O.M., Codd, G.A. and Carmichael, W.W. (1984): Toxic blue-green algal blooms in Europe: A growing problem. *Ambio* 13 (4): 244-247.

Skulberg, O.M. (1984): Landbruksforurensninger og problemer med masseutvikling av blågrønnalger. Jordbrukets förorening av vattenmiljön, 20. nordiska symposiet om vattenforskning, Hägersten, 8.-10. mai 1984. NORDFORSK, Miljövärdsserien, publ. 2: 183-194.

Skulberg, O.M. (1984): Directory to toxic cyanophyte literature from Norden. Norsk institutt for vannforskning, F-83462, 26. sept. 1984. 4. pp.

\*

Berg, K. and Søli, N.E. (1985): Toxicity studies with the blue-green alga Oscillatoria agardhii from two eutrophic Norwegian lakes. Acta vet. scand. 26: 363-373.

Berg, K. and Søli, N.E. (1985): Effects of Oscillatoria agardhii-toxins on blood pressure and isolated organ preparations. Acta. vet. scand. 26: 374-384.

Berg, K. (1985): Toksinproduserende blågrønnalger i ferskvann. Forekomst, toksinkarakterisering, innvirkning på vannkvalitet. Forskningsoppgave for graden Doctor scientiarum ved Norges veterinærhøgskole, november 1985.

Norsk institutt for vannforskning (1985): Vannblomst med giftige blågrønnalger i Rogaland. Undersøkelser 1984. Notat 0-82087, 28. januar 1985. 7 pp.

Norsk institutt for vannforskning (1985): Giftproduserende blågrønnalger i Vestfold. Resultater av undersøkelser i 1984. Rapport 0-84135, 18. april 1985. 21 pp.

Skulberg, O.M. and Skulberg, R. (1985): Planktic species of Oscillatoria (CYANOPHYCEAE) from Norway - characterization and classification. Arch. Hydrobiol. Suppl. 71 (1/2): 157-174.

\*

Aune, T. and Berg, K. (1986): Use of freshly prepared rat hepatocytes to study the toxicity of blooms of the blue-green algae Microcystis aeruginosa and Oscillatoria agardhii. J. Toxicol. Environ. Health 19: 325-336.

Berg, K., Skulberg, O.M., Skulberg, R., Underdal, B. and Willén, T. (1986): Observations of toxic blue-green algae (CYANOBACTERIA) in some Scandinavian lakes. *Acta. vet. scand.* 27: 440-452.

Krishnamurthy, T., Szafraniec, L., Sarver, E.W., Hunt, D.F., Shabanowitz, J., Carmichael, W.W., Missler, S., Skulberg, O.M. and Codd, G. (1986): Amino acid analysis of freshwater blue-green algal toxic peptides by fast atom bombardment tandem mass spectrometric technique. Proceedings of 34th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Cincinnati, Ohio. pp. 93-94.

Krishnamurthy, T., Carmichael, W.W., Sarver, E.W. and Skulberg, O.M. (1986): Investigations of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification and characterization of peptides from Microcystis aeruginosa and Anabaena flos-aquae. *Toxicon*, 24(9): 865-873.

Norsk institutt for vannforskning (1986): Giftproduserende blågrønnalger i Vestfold. Resultater av undersøkelser i 1985. Rapport 0-84135, 10. januar 1986. 32 pp.

Norsk institutt for vannforskning (1986): Observasjoner av toksinproduserende blågrønnalger i Rogaland 1985. Notat, 22. april 1986. 8 pp.

Skulberg, O.M. (1986): Directory to toxic cyanophyte literature from Norden. Norsk institutt for vannforskning. F-83462, 26. nov. 1986. 12 pp.

\*

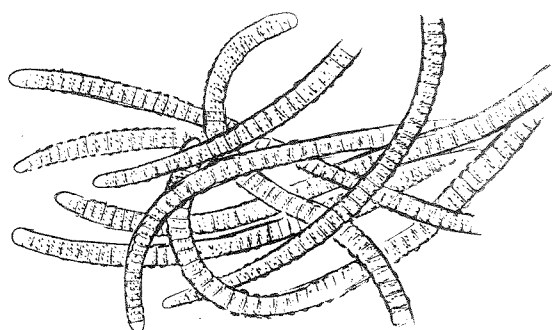
Berg, K., Carmichael, W.W., Skulberg, O.M., Benestad, Chr. and Underdal, B. (1987): Investigation of a toxic water bloom of Microcystis aeruginosa (CYANOPHYCEAE) in Lake Akersvatn, Norway. *Hydrobiologia*, 144: 97-103.

Berg, K., Skulberg, O.M. and Skulberg, R. (1987): Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality - a laboratory study. *Archiv für Hydrobiologie*, 108(4): 549-563.

- Berg, K. and Aune, T. (1987): Freshly prepared rat hepatocytes used in screening the toxicity of blue-green algal blooms. *J. Toxicol. Environ. Health*, 20: 187-197.
- Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O., Kujari, H.P. and Skulberg, O.M. (1987): A comparison of toxins isolated from the cyanobacteria Oscillatoria agardhii and Microcystis aeruginosa. *Comp. Biochem. Physiol.* (in press).
- Norsk institutt for vannforskning (1987): Giftproduserende blågrønnalger i Vestfold. Undersøkelser i 1986 utført for Miljøvernavdelingen, Fylkesmannen i Vestfold. Rapport E-83462, 25. mars 1987. 21 pp.
- Norsk institutt for vannforskning (1987): Giftproduserende blågrønnalger i Akersvatnet. Resultater av undersøkelser i 1986 for Vestfold interkommunale vannverk (VIV). Rapport O-84135, 9. mars 1987. 32 pp.
- Westgaard, H.K. (1987): Faktorer som påvirker toksinproduksjon hos cyanobakterien Microcystis aeruginosa Kütz. Cand.scient.-oppgave i biologi. Universitetet i Oslo. 110 pp.
- Jantzen, E., Aase, B. and Utkilen, H.: Chemotaxonomic studies of Oscillatoria - isolation and chemical composition of lipopolysaccharides. V International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes, (in prep. April 1988).



# Blågrønnalger — Lukt og smak



## AKTUELLE MIKROORGANISMER

Artene og deres livsutfoldelse former menneskets biologiske miljø. Helsepåvirkninger gjør seg gjeldende på flere måter, f.eks.:

- infeksjon, forårsaket av endoparasitter
- infestasjon, forårsaket av eksoparasitter

Men også organismenes stoffskifteprodukter som medfører kjemiske påvirkninger av negativ natur, hører inn i denne sammenheng:

- allergi, forårsaket av allergener
- allelopati, forårsaket av giftige eller sjenerende stoffer

Lukt- og smaksstoffer dannet av mikroorganismer og som registreres som ubehagelige, regnes med til denne siste kategori (Rice 1974). De kan medføre betydelig sanitær ulempe. Det er i første rekke to organisme-grupper - blågrønnalger og actinomyceter - som lager slike problemer knyttet til vann. Selv om det er blågrønnalger som er hovedtema i denne behandling, kan det være nærliggende å nevne litt om actinomyce-ter for oversiktens skyld. Når det gjelder algene generelt som årsak til lukt- og smaksproblemer, henvises til litteratur (Palmer 1959, Skulberg 1964, Holden 1970).

Actinomyceter Gruppen Actinomycetes omfatter hovedsakelig gram-positive bakterier som i alle utviklingsstadier er ubevegelige. De tilhørende organismer fordeler seg på tre ordener som har flere arter funnet i vann. Det er imidlertid i særlig utstrekning ordenen Actinomy-cetales som er representert med problemorganismer for vannkvalitet i sammenheng med lukt- og smakspåvirkning.

Begrepet akvatiske actinomyceter er flertydig. Actinomycetene er typiske organismer i jord, og vaskes ut fra slike lokaliteter til vann i form av mycel eller sporer. De fleste former vil overleve i vann, men uten å utvikle noen aktiv vegetasjon der. Bare et lite antall arter er funnet direkte å vokse i begroinger eller i plankton i vann. Noen eksempler på slekter med slike arter er Nocardia, Streptomyces og Micromonospora. Slekten Streptomyces er velkjent som organismer med produksjon av lukt- og smaksstoffer (Waksman 1950). Det er dokumentert at arter av denne slekt utvikler seg i ulike vannforekomster. Jordaktig lukt og smak av vann - på grunn av stoffet geosmin - blir vanlig forårsaket av masseutvikling av arter som tilhører slekten Streptomyces (Cross 1981).

Blågrønnalger. På tilsvarende måte som actinomycetene har blågrønnalgene stor forekomst i jord. Men en betydelig andel arter er dessuten knyttet til begroinger og plankton i vann. En parallellitet med actinomycetene er det også at blågrønnalgene har arter med produksjon av sekundære metabolitter som lager lukt- og smakspåvirkning av vann. I Tabell 9 er det gitt eksempler på arter fra norske vannforekomster som har slike egenskaper.

Tabell 9. Arter av blågrønnalger (CYANOPHYCEAE) med påvist produksjon av lukt- og smaksstoffer.

ORDEN	FAMILIE	SLEKT OG ART
CHROOCOCCALES	CHROOCOCCACEAE	<i>Microcystis aeruginosa</i> Kütz
HORMOGONALES	NOSTOCACEAE OSCILLATORIACEAE	<i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>Oscillatoria agardhii</i> <i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i> <i>Oscillatoria bornetii</i> var. <i>intermedia</i> <i>Oscillatoria bornetii</i> f. <i>tenuis</i> <i>Oscillatoria brevis</i> <i>Oscillatoria curviceps</i> <i>Oscillatoria formosa</i> <i>Phormidium tenue</i> <i>Phormidium</i> spp.

## LUKT- OG SMAKSSTOFFER

Sammen med actinomycetene er blågrønnalgene de mest fremtredende organismer med produksjon av kjemiske forbindelser som gir lukt- og smaksreaksjoner. I dette avsnitt av rapporten vil blågrønnalgene og deres sekundære metabolitter av slik natur behandles og vurderes i praktisk sammenheng. Stoffene betegnes luktmetabolitter (VOBS - volatile organic biogenic substances).

### Sekundær metabolisme og sekundære metabolitter

Fra gammelt har biokjemisk aktivitet i organismer blitt inndelt i primær og sekundær metabolisme. En rekke kriterier har blitt benyttet for å karakterisere et stoffskifteprodukt som primært eller sekundært. Primære metabolitter vil være vanlige og vidt utbredt i naturen, mens sekundære metabolitter er spesielle stoffer med sparsom forekomst. For å fremheve forskjellen mellom disse to grupper metabolitter, kan følgende sammenlikning være til hjelp (Tabell 10, etter Campbell 1984).

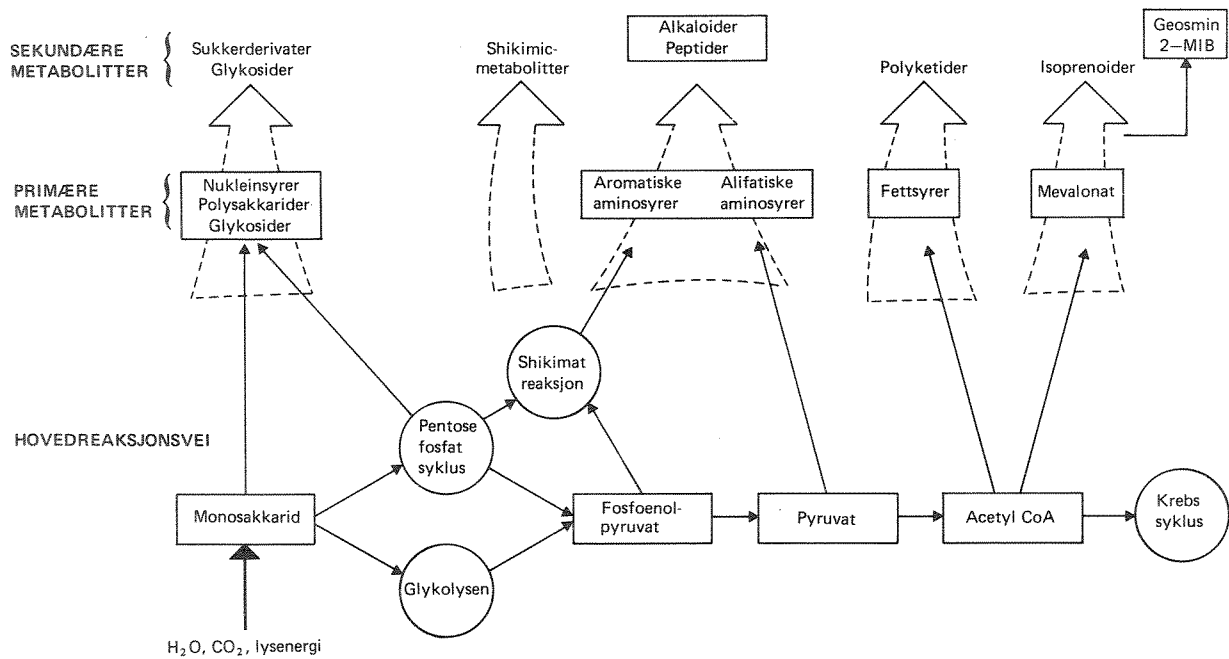
Tabell 10. Sammenlikning av primære og sekundære metabolitter.

PRIMÆRE METABOLITTER	SEKUNDÆRE METABOLITTER
Relativ enkel kjemisk sammensetning	Kompleks kjemisk sammensetning
Dannet gjennom vanlig synteseoprosess	Dannet ved lang, og ofte innviklet, synteseoprosess
Aktivt omsatt i cellenes stoffskifte	Blir i liten grad omsatt ved cellenes stoffskifte
Har viktig funksjon i organismens fysiologiske oppbygning	Vanskelig å integrere i organismens vanlige fysiologiske oppbygning
Er tilstede under hele livscyklus til organismen	Dannet under bestemte faser av livscyklus eller spesielle voksebetingelser
Er nødvendig for organismens normale vekst	Er unødvendig for organismens normale vekst

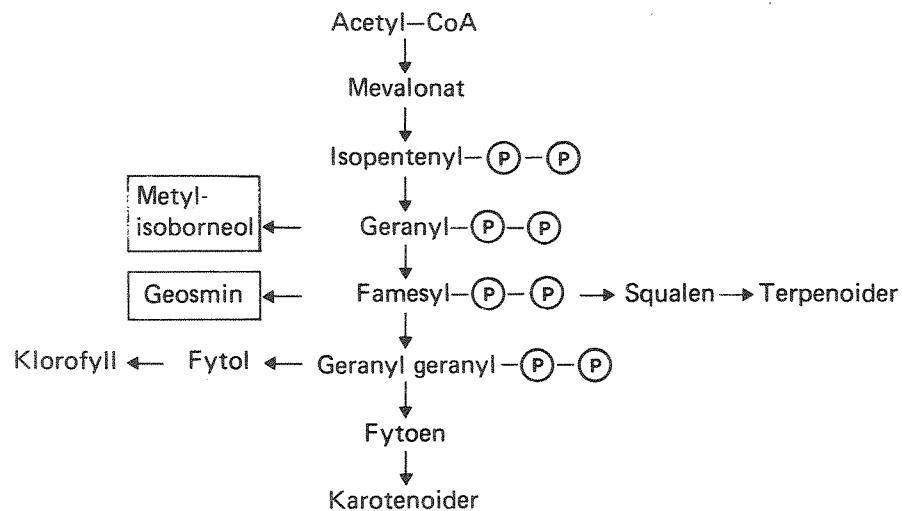
Såvel toksinene som lukt- og smaksstoffene produsert av blågrønnalger hører til gruppen sekundære metabolitter. For å illustrere hvordan de dannes i stoffskiftesammenheng er Figur 20 utarbeidet. Hovedreaksjonsveien i karbonstoffskiftet til organismen gir forløperne til sekundære metabolitter, f.eks.:

aromatiske og alifatiske aminosyrer	→	toksiner av alkaloid- og peptidnatur
squalener	→	lukt- og smaksstoffer, bl.a. geosmin og metylisoborneol

Noe mer detaljert kan biosynteseveien for geosmin og metylisoborneol (MIB) antydes (Figur 21). Det er interessant å merke den nære sammenheng mellom disse stoffene og klorofyll med hensyn til dannelses måte. Dette er sannsynlig en delvis forklaring på at lysfaktoren har betydning for f.eks. produksjon av geosmin i *Oscillatoria* (Næs et al. 1985). Fyto1 - som er en del av klorofyllmolekylet - blir også dannet gjennom den isoprenoide syntesevei.



Figur 20. Karbonstoffsifte og dannelselse av sekundære metabolitter hos blågrønnalger



Figur 21. Biosynteseveien for terpenoider med forløperne for geosmin og metylisoborneol.

## Kjemiske forutsetninger og stoffer

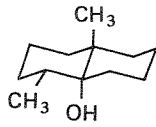
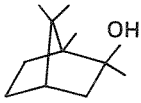
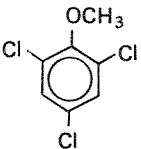
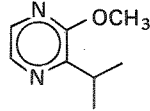
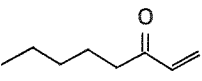
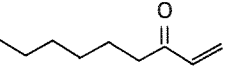
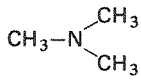
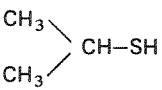
Det er fremskrittene i moderne analyseverktøy innen organisk kjemi som forskningsarbeidet med lukt- og smaksstoffene nå tar utgangspunkt i. Naturstoffenes kjemiske forhold har fått ny oppmerksomhet. Gasskromatografi og røntgenanalyse har bl.a. blitt koblet i fruktbare metoder. Den kjemiske struktur til et lukt- og smaksstoff kan bestemmes ut fra små mengder (< 1 milligram). Stereokjemiske detaljer i molekylene som har betydning for deres bioaktivitet kan klarlegges. Resultatene bidrar f.eks. til forståelse av stoffenes persepsjon (gjennom de kjemiske sanser). Et stort forskningsfelt tegner seg - kjemisk økologi - knyttet til de sekundære metabolitter med lukt- og smaksegenskaper.

Sanseapparatets fysiologi og stoffenes kjemiske egenskaper danner et viktig studiefelt (kjemoresepsjon). Gjennom dette fremkommer forståelsen av forbindelsen mellom stimuli (kjemisk stoff) og reseptor (sanseorgan) samt sansningens helhetlige funksjon. Luktstimuli er knyttet til bestemte molekylære egenskaper ved stoffene og den enkelte arts sanseapparat. I internasjonal forskning studeres bl.a. hvordan luktmolekylenes kompleksitet er bestemmende for stoffenes informasjonsmengde (f.eks. om små molekyler bærer mindre informasjon enn større, sammensatte molekyler).

Noen av de best kjente naturlige stoffer og stoffstrukturer forbundet med vanlig lukt- og smakspåvirkning av vann er vist i tabell 11. De opptrer mer eller mindre hyppig i vannforekomstene. Mens f.eks. 2, 4, 6 trikloranisol er forholdsvis sjelden, er 2-isopropyl-3-metoxypyrazin oftest til stede i vann (Suffet et al. 1984, Sävenhed 1986).

Lukt- og smaksstoffer som finnes i vann kan ha ulik opprinnelse. De kan være tilført systemet utenfra, eller være dannet i systemet. I praktisk vannressursforvaltning kan det være formålstjenlig å skille mellom stoffer som er et direkte resultat av forurensning (f.eks. primæreffekt, utslipp til resipient) eller som indirekte har en slik sammenheng (f.eks. sekundæreffekt, forurensning gir opphav til organismeutvikling med produksjon av lukt- og smaksstoffer).

Tabell 11. Eksempel på kjemiske forbindelser som gir lukt- og smakspåvirkning av vann

Kjemisk navn	Forkortet betegnelse	Struktur	Sanseinntrykk
Trans -1, 10 - dimetyl- trans - 9 decalol	GEOSMIN		Jordaktig lukt
2 - metylisoborneol	MIB		Mugglukt
2,4,6, - trikloranisol	TCA		Mugglukt
2 - isopropyl - 3 - metoxy-pyrazin	IPMP		»Potetkjeller» lukt
Dimetyldisulfid	DMS	$\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$	Løkaktig lukt
1 - octen - 3 - on	OCTENON		Soppaktig lukt
1 - nonen - 3 - on	NONENON		Soppaktig lukt
Trimetylamin	TMA		Fiskaktig lukt
Isopropylmerkaptan	IPM		Løkaktig lukt

### Biologiske forutsetninger og stoffproduksjon

Lukt- og smaksstoffer (VOBS) som dannes av bl.a. alger, blågrønnalger og actinomyceter kan betegnes som naturlige luktmetabolitter. Men det er ofte i forbindelse med forurensningssituasjoner at de aktuelle organismene utvikler masseforekomst og derfor gir opphav til praktiske problemer, f.eks. i sammenheng med drikkevannsforsyning eller akvakulturanlegg. Vanlig registrerte forbindelser med denne biologiske opprinnelse er geosmin, metylisoborneol (MIB) (Zoeteman and Piet 1974) og 2-isopropyl-3-methoxypyrazin (IMP) (Gerber 1983). Forbindelsene er tildels svært flyktige, og dette forhold understreker behovet for følsomme måleinstrumenter. Luktterskel-verdiene for stoffene er lave, for IMP under f.eks.  $0,002 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Sensorisk deteksjon er derfor et egnet redskap ved undersøkelser av luktmetabolitter.

Økologiske faktorer som påvirker dannelsen av luktmetabolitter omfatter bl.a. temperatur, lys og næringstilgang. Ved laboratorieforsøk (Wood et al. 1985) er det vist at minimumstemperaturen for geosmindannelse hos actinomyceten Streptomyces albidoflavus var omlag  $15^{\circ}\text{C}$ . Størst geosminproduksjon ble oppnådd ved  $30^{\circ}\text{C}$ . I overensstemmelse med dette er erfaringene om at problemer med usmak på drikkevann knyttet til geosmin ofte inntreffer i perioder med vanntemperatur over  $15^{\circ}\text{C}$  (Weete et al. 1979). Tilsvarende er rapportert for blågrønnalgenes vedkommende. Feltstudier har f.eks. vist at det er nær sammenheng mellom høy temperatur og produksjon av MIB til Oscillatoria curviceps (Izaguirre et al. 1982). Effekten av nitrogen- eller fosforbegrensning for geosminproduksjon til Oscillatoria bonnetii f. tenuis er blitt undersøkt (Kristiansen 1987). Såvel nitrogen som fosfor hadde effekt på blågrønnalgen, og stigende konsentrasjoner av næringsstoffene ga tilsvarende økt geosminproduksjon. Også ved denne undersøkelsen ble det en bekreftelse på sammenheng mellom isoprenoid biosyntesevei og dannelsen av geosmin. Geosmin-syntesen synes korrelert med klorofyllmengden i blågrønnalger, og er dermed inverst relatert til lysintensitet (Næs 1987).



## SENSORISK PÅVIRKNING AV VANN

Hvordan vann ser ut, smaker og lukter, eller forøvrig oppleves - føles - gjennom sanseapparatet, kan samles under betegnelsen sensoriske egenskaper. For vannressursforvaltning er dette et sentralt begrep når det gjelder vurderinger av forurensningsvirkninger på vannkvalitet. Uønsket lukt- og smak på vann er et problem som ofte er til stede. For å kunne gjøre tiltak, og ordne opp i aktuelle situasjoner, er det nødvendig med kunnskap om årsaksforhold og hjelpemidler til å identifisere og kvantifisere stoffene.

Lukt og smak har nær tilknytning til hverandre. Mye av det vi kaller smak er egentlig en reaksjon på luktstoffer. Det er vanlig å tillegge smaken bare fire sansekvaliteter - surt, søtt, salt og bittert. De finere nyanser av smak er forbundet med luktesansen (Wenzel 1973). Lukt- og smaksegenskaper bedømmes i organoleptiske tester (Powers 1984).

Bruken av vann til vannforsyning og rekreasjon setter bestemte kvalitetskrav. Et egnet vann skal være klart, uten fremtredende lukt, smak eller farge (SIFF 1987). Vann benyttet til produksjon av matprodukter (fisk, grønnsaker osv.) fordrer også et rent vann som ikke gir produktene uønsket lukt- og smakspåvirkning. Indirekte kan dessuten husdyrprodukter (melk, egg, kjøtt osv.) få dårlig smak gjennom bruk av vanningsvann med innhold av stoffene det dreier seg om (Tabell 11). Vi kan sammenfatte dette innenfor begrepet sensoriske kvalitetskrav til vann.

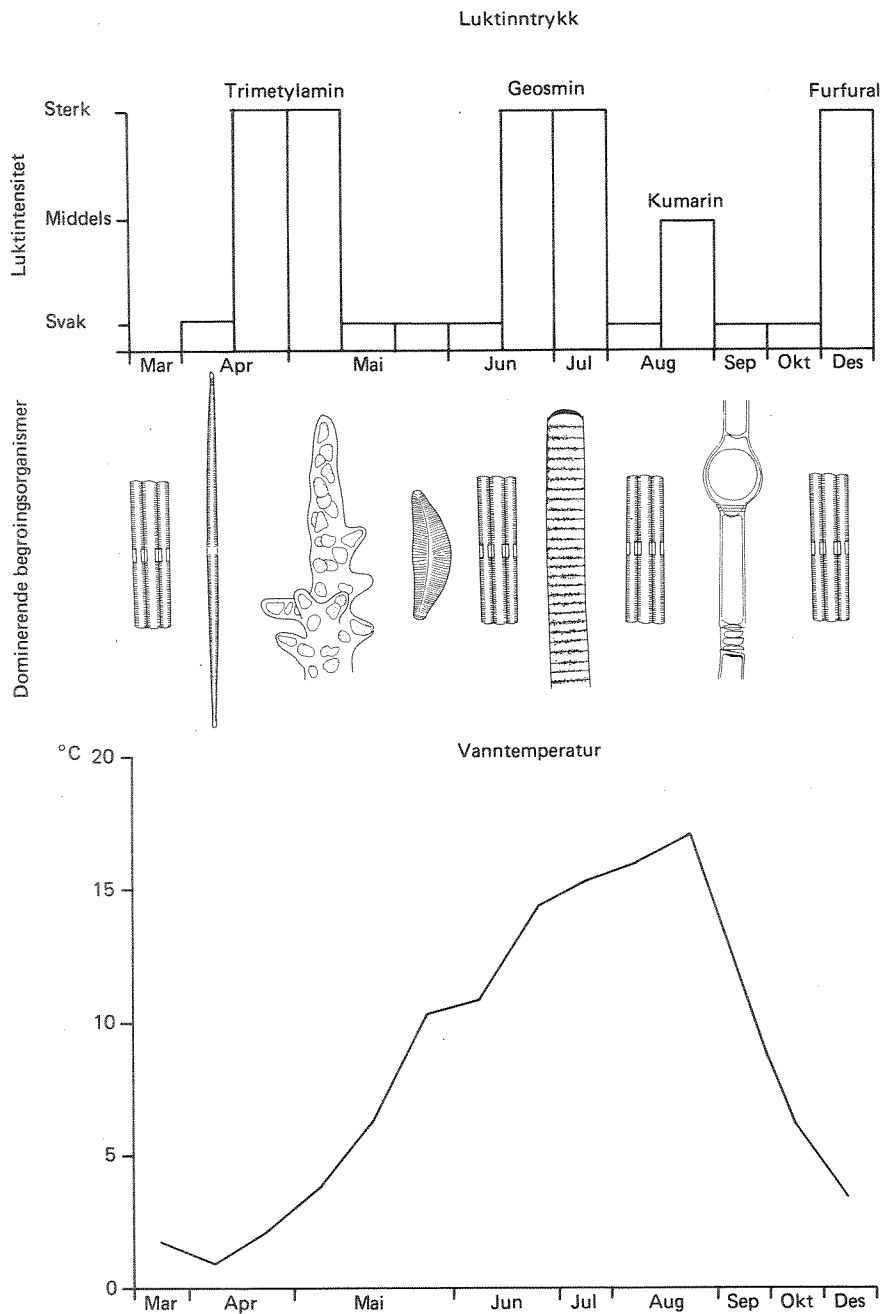
### Glåma som eksempel

Utviklingen av vegetasjon av blågrønnalger i Glåma gir gode muligheter til undersøkelser av fenomener knyttet til uønsket sensorisk kvalitetspåvirkning av vannmassene (NIVA 1983, 1986c). Det er spesielt vassdragsstrekningen Mjøsa-Sarpsfossen som har dannet bakgrunn for observasjonene. Med mellomrom inntreffer her situasjoner med særpreget lukt og smak på elvevannet. Forholdet registreres bl.a. ved vannverkene i Akershus og Østfold som bruker Glåma til råvannskilde. Regelmessig rapporteres det dessuten fra sportsfiskere om dårlig smaks kvalitet på fisk. Dette gjelder særlig stasjonær fisk som er fanget i vassdragets stilleflytende partier og evjer. Årsaken til disse forhold er i stor grad blågrønnalgens vegetasjonsutvikling med dannelse av spesielle sekundære metabolitter (Skulberg 1980, Berglind et al. 1983a).

Det er en artsrik og frodig utvikling av alger i Glåma (Lindstrøm et al. 1973, Skulberg and Lillehammer 1984). Fenologiske forhold har stor betydning for hvordan lukt og smak i vann gjør seg gjeldende. I figur 22 er det gjort en grafisk fremstilling som gir eksempel på dette. Observasjonene er gjort i Glåma ved Solbergfoss i 1984 (NIVA 1986c). Vanntemperaturens variasjoner er vist i kurven nederst på figuren. De fremtredende arter i begroingssamfunnet gjennom året er vist med tegningene av organismer. Den tilhørende beskrivelse av luktinntrykket av Glåma-vannet er fremstilt i søylediagrammet øverst på figuren. I tidsrommet april-mai var det en karakteristisk lukt av trimetylamin som var sammenfallende med masseutvikling av chrysophyceen Hydrurus foetidus. En karakteristisk lukt av geosmin fulgte utviklingen av Oscillatoria bornetii f. intermedia i juni-juli. Aromatisk lukt av vannet ble registrert i perioder med kiselalger (særlig Fragilaria capucina). Tilsvarende var masseutvikling av grønnalger fremtredende mens Glåma-vannet hadde en kumarinaktig lukt. Det kan nevnes at organismenes luktproduksjon er en tilsynelatende artsspesifikk egenskap (Sivonen 1982).

Blågrønnalgene er et fremtredende element av vegetasjonen i vassdragets nedre løp, og forøvrig i områder med forurensning som fremmer eutrofiering. Både i plankton og benthos gjør blågrønnalgene seg sterkt gjeldende. I det følgende blir oppmerksomheten rettet mot forekomster av organismer innen slekten Oscillatoria. Dette er blågrønnalger med stor økologisk betydning i vassdraget. I planktonet er arten Oscillatoria bornetii f. tenuis (Skulberg and Skulberg 1985) et dominerende innslag. Begroingssamfunnene er tilsvarende preget av Oscillatoria bornetii f. intermedia (Figur 22). Stammer av disse artene er påvist å ha produksjon av bl.a. luktstoffet geosmin (NIVA 1986c).

Geosmin - 1,10-dimetyl-9-dekalol, molekylvekt 182 dalton, kokepunkt 270 °C -bestemmes ved hjelp av gasskromatografisk teknikk ("closed loop stripping" og etterfølgende GC-MS analyse). Deteksjonsgrensen er 0.002 µg·l<sup>-1</sup> (Zoeteman 1978). Luktgrensen for geosmin er 0.010 µg · l<sup>-1</sup> - TOC, "threshold odour concentration" (van Gemert et al. 1977). Geosmin produseres i organismenes aktive vekstfase og er ikke et nedbrytningsprodukt.



Figur 22. Algutvikling i benthos og sensorisk påvirkning av vannkvalitet.

Glåma ved Solbergfoss, Østfold, 1984 (NIVA 1986c).

Begroingsorganismene representerer slektene Fragilaria, Synedra, Hydrurus, Cymbella, Oscillatoria og Oedogonium.  
Figurforklaring, se tekst.

Geosmindannelse i benthos. I 1983 ble det gjort observasjoner av geosminproduksjon i begroingssamfunn. Prøvetakingsstedene var ved Minnesund og Solbergfoss. Materiale av begroingsalger ble innsamlet fra 100 cm<sup>2</sup> bunnareal og oppbevart i prøver med vannvolum 1 l. I laboratoriet ble prøvene først dampdestillert. Destillatene og vannprøvene ble deretter tilsatt indre standard og ekstrahert med diklormetan. Ekstraktene ble redusert i volum og rensset på kiselgel med 15 % vann med diklormetan som elueringsmiddel før gasskromatografisk analyse. Metylisoborneol og geosmin ble identifisert ut fra retensjonstid. Konsentrasjonene ble beregnet ut fra indre standard. Geosmin i benthosprøven ble også identifisert ut fra lukt ved å gjenta operasjonen på nytt med detektorflamme slukket. Geosminlukten kunne da tydelige kjennes ved detektorutløpet sammenfallende med geosminens retensjonstid.

Resultatene av de gasskromatografiske bestemmelser er stilt sammen i Tabell 12. Geosmin ble påvist i alle prøvene, og dannes ut fra dette gjennom hele vegetasjonsperioden. Det var høyere verdier for geosmin ved Solbergfoss enn ved Minnesund. Dette har sannsynlig sammenheng med begroingssamfunnets andel av blågrønnalger. Arter av Oscillatoria - med Oscillatoria bornetii f. intermedia i dominans - var typisk til stede i prøvene. Det ble ikke funnet mycel av actinomyceter ved den mikroskopiske analyse, men ved kulturforsøk kunne Streptomyces - liknende former dyrkes frem. Den kvantitative betydning av blågrønnalger i benthos i Vormå-Glåma er økende nedover i vassdraget fra Mjøsa til estuaret (Berglund et al. 1983b).

Med grunnlag i verdien for luktgrensen til geosmin (0.01 µg·l<sup>-1</sup>) gir resultatene grunnlag for følgende vurderinger av begroingssamfunnets mulige påvirkning av vannkvalitet. Selv om tallene er maksimalverdier, forteller de at begroingssamfunn kan være en viktig årsak til lukt- og smakspåvirkning av vannet i Glåma.

- Ved Minnesund kan det tilhørende begroingssamfunnet på 1 m<sup>2</sup> bunnareal sette lukt- og smak på en vannmasse tilsvarende 100-250 m<sup>3</sup>.
- Ved Solbergfoss kan det tilhørende begroingssamfunnet på 1 m<sup>2</sup> bunnareal sette lukt- og smak på en vannmasse tilsvarende 1000-4000 m<sup>3</sup>.

Begroingssamfunnet er stedsbundet. Det kan f.eks. ikke på samme måte som planktonet forsvinne gjennom utskiftning av vannmassene. Kontinuerlig - men avhengig av tilstedeværelse av de aktuelle geosminproduserende stammer av mikroorganismer - forsynes vannmassene som er i kontakt med begroingssamfunnet, med stoffskifteproduktene som gir lukt og smak.

Tabell 12. Resultater av gasskromatografisk bestemmelse av geosmin i benthos. Observasjoner foretatt i 1983.

OBSERVASJONER	MINNESUND Geosmin $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	SOLBERGFOSS Geosmin $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Juni	8	62
Juli	9	397
August	24	198
Middelverdi	14	219

Geosmindannelse i plankton. De mest kjente tilfeller med lukt- og smakspåvirkning av vannet på vassdragsstrekningen Mjøsa-Glåma-Fredrikstad har vært forårsaket av blågrønnalger i plankton (Holtan 1979, Berglind et al. 1983a). Blågrønnalger av gruppen Oscillatoria bornetii er et vanlig og vedvarende innslag i vassdragets algevegetasjon. Planktiske former - først og fremst Oscillatoria bornetii f. tenuis - har periodiske oppblomstringer med stammer som har geosmin-produksjon. Med utgangspunkt i de foreliggende erfaringer, kan det angis noen holddepunkter for effekten av blågrønnalgene i plankton på lukt og smak av vannmassene i Glåma.

- $< 0.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$  biomassekonsentrasjon av en geosminproduserende stamme av Oscillatoria bornetii f. tenuis gir en beskjeden påvirkning av vannmassenes lukt og smak.
- $0.5\text{-}1.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-3}$  biomassekonsentrasjon av en geosminproduserende stamme av Oscillatoria bornetii f. tenuis gir en sterk påvirkning av vannmassenes lukt og smak.

I Tabell 13 er det gitt eksempler på konsentrasjoner og mengder av blågrønnalger (Oscillatoria bornetii f. tenuis) i Glåma vannmasser i en vegetasjonsperiode (1976) med lukt- og smaksproblemer. Det var ikke geosmin alene som var årsak til de praktiske problemer. Også bl.a. metylisoborneol blir produsert av mikroorganismer i vannmassene og bidrar til å prege vannets sensoriske egenskaper.

Når det gjelder smak og lukt av vann forårsaket av algevekst, er dette et mangesidig problem. Generelt kan en si at sannsynligheten for smak og lukt av vann øker med økende innhold av organismer. I vann med stort innhold av alger vil det nesten alltid være smak på råvannet,

uansett hvilke arter som utgjør algebiomassen (Palmer 1959). For visse arter gjelder imidlertid at selv et relativt lite individtall i vannet kan gi smak og/eller lukt. Som en generell rettesnor kan det regnes med at når organismeinnholdet overskrider omlag  $10^6$  celler  $\cdot l^{-1}$  vil det være stor sannsynlighet for at uheldig lukt- og smakspåvirkning av drikkevann kan opptre (Skulberg 1964).

Tabell 13. Eksempler på konsentrasjoner og mengder av blågrønnalger i Glåmas vannmasser i en vegetasjonsperiode (1976) med lukt- og smaksproblemer

Lokalitet	MINNESUND		FETSUND		SOLBERGFOSS		SARPSBORG	
	Konsentrasjon $cm^{-3}$	Mengde $cm^3$	Konsentrasjon $cm^{-3}$	Mengde $cm^3$	Konsentrasjon $cm^{-3}$	Mengde $cm^3$	Konsentrasjon $cm^{-3}$	Mengde $cm^3$
Juli	0.043	26.4	0.035	25.9	0.065	50.1	0.043	33.1
August	0.457	124.8	0.565	199.4	0.457	166.3	0.515	205.7
September	1.435	368.8	1.500	493.5	0.522	179.6	0.870	299.3
Oktober	1.196	148.3	1.261	345.5	0.739	249.0	0.957	322.5
November	0.652	99.8	0.217	77.7	0.261	114.3	0.370	162.1

## KJEMISK ØKOLOGI

På mange måter tegner forskningen om blågrønnalgenes sekundære metabolitter opp konturene av et eget forskningsfelt. Det har forankring i de moderne analysemetoder og forståelsen av de aktuelle forbindelsenes kjemiske egenskaper. Spørsmålene som studeres er bl.a. hvordan stoffene dannes, hvordan de oppfører seg i miljøet og den biologiske betydning de har. Bare en innledende utforskning av fagfeltet er foreløpig blitt utført (Persson 1983). Men erfaringene og ny erkjennelse som allerede er fremkommet, har vært viktige i både vitenskapelig og praktisk sammenheng (Skulberg 1988).

Når det gjelder vannkvalitetsbegrepet, kan det være av interesse i denne forbindelse å understreke organismelivets tosidige rolle: Det levende i vannet er såvel et produkt av vannkvalitet, som medvirkende årsak til vannets kjemiske karakter. Vannets sensoriske egenskaper er samtidig avgjørende for organismelivet som utfolder seg i vannet. I terrestriske økosystemer har betydningen av f.eks. lukt- og smaksstoffer lenge vært under utforskning (Rosenthal and Bell 1979). De tilsvarende fenomener i akvatisk miljø blir nå tatt opp til bearbeiding

(Skulberg 1988). Foruten lukt- og smaksstoffene som blir dannet ved organismeaktivitet, vil hele rekken av liknende kjemiske forbindelser - som direkte og indirekte gjennom forurensning medfører påvirkning av vannkvalitet - bli inkludert i forskningsbestrebelsene (van Gemert 1977).

### VANNETS SENSORISKE EGENSKAPER - FORURENSNING

I et tidsmessig vannkvalitetsbegrep vil egenskaper knyttet til menneskenes direkte sansbare opplevelse av vannet - som angår sanseintrykkene - stå sentralt. Både når det gjelder bruken av vann til vannforsyning (drikkevann), og i forbindelse med vann i naturen (friluftsliv etc.), vil kravene til f.eks. vannets renhet - slik det umiddelbart er sanset og opplevd - være en hovedsak. Disse sider har tidligere tildels vært inkludert i hva som ble betegnet vannets estetiske forhold. Imidlertid er begrepet estetisk først og fremst forbundet med kunstteori og den tilhørende gren av filosofien. Det er samtidig et uttrykk som brukes flertydig, og med uklar avgrensning. Når det gjelder ressursforvaltning, og i forbindelse med vannforurensningsproblemer, er det behov for et begrep med sterkere naturvitenskapelig forankring. Sensoriske egenskaper kan være et praktisk uttrykk til å avgrense helheten av forhold ved vannet som direkte registreres med sansene (lat. sensus, sans).

Vannkvalitet er et objektivt begrep - helheten av de egenskaper som vannet besitter. Hvordan disse egenskapene kan passe for den bruk vi vil gjøre av vannet, er relative - og tildels subjektive - i forhold til den hensikt vi har. Sensorisk vannkvalitet omfatter den del av kvalitetsbegrepet som angår egenskaper oppfattet gjennom sanseorganene (f.eks. utseende, lukt og smak, konsistens). Disse egenskapene av fysisk, kjemisk eller biologisk natur vil prege vannet avhengig av vekslende forhold og sammenheng.

I første omgang vil det være tanke på menneskenes bedømmelse av vannkvalitet. Her kommer vannets lukt, smak, utseende og reaksjon på hudkontakt inn. Med økende krav til hygienisk tilfredsstillende vann (næringsmiddel), og større behov for vann i rekreasjonssammenheng, vil det oppstå nødvendighet for en bedre faglig ivaretagelse av disse sider ved vannet. Den praktiske forvaltning av vannkvalitet bør tilpasses bestrebelsene med å fremme livskvalitet for menneskene. Det er ikke nok at vann kan brukes, eller være ufarlig. Det skal være rent, virke tiltalende og stimulere til kontakt.

Men vannets sensoriske egenskaper har også en annen biologisk dimensjon innenfor ressursforvaltning. Det begynner å bli forståelse for hvordan det kjemiske miljø har betydning for spesielle sider av livsutfoldelse til organismene i vannet. Organismene har sine kjemiske sanser, med vesentlige funksjoner for overlevelse og trivsel. Det finner sted kjemisk kommunikasjon mellom organismer. Stoffer virker tiltrekkende eller frastøtende. Organismer orienterer seg etter luktinntrykk. Vannets sensoriske egenskaper vil derfor også omfatte hvordan kjemiske sanser hos organismelivet i vannet kan influeres av forholdene. En forurensningsvirkning kan f.eks. gjøre seg gjeldende ved at et stoffutslipp påvirker det kjemiske miljø til en art, og lager forstyrrelse eller ødeleggelse av sansningens funksjon til organismen. For å påvise dette er det nødvendig å kjenne sanseapparatets fysiologi. Spesielt viktig er kjennskapen til forbindelsen mellom stimuli (kjemisk stoff) og reseptor (sanseorgan), samt organismens reaksjon med adferd (etiologi).

Forskningsfeltet kjemisk økologi vil få stor betydning for vannressursforvaltning. Det blir nødvendig å kunne karakterisere vannforekomstenes miljø ut fra den nye erkjennelse. De enkelte vannsystemer vil fremvise særegne forhold, og fenologiske forløp blir betydningsfulle for hvordan bl.a. forurensningspåvirkning vil gjøre seg gjeldende (Skulberg 1988).



**BLÅGRØNNALGER – LUKT OG SMAK. NORSKE RAPPORTER OG PUBLIKASJONER**

\*

Skulberg, O.M. (1964): Algal problems related to the eutrophication of European water supplies, and a bio-assay method to assess fertilizing influence of pollution on inland waters. In: *Algae and man*, ed. D.F. Jackson. Plenum Press, New York. pp. 262-299.

\*

Skulberg, O.M. (1972): Blågrønnalger i norske vannforekomster, mulige konsekvenser av sunnhetsmessig betydning for mennesker og dyr. *Tidsskr. norske Lægeforen.* 92 (12): 851-854.

\*

Norsk institutt for vannforskning (1977): Biologisk bedømmelse av vannkvalitet i Lyseren. Rapport 0-25/75, Oslo. 22. mars 1977. 16 pp.

\*

Norsk institutt for vannforskning (1978): Undersøkelser av lukt- og smakskomponenter i algeholdig drikkevann. Rapport XK-18, Oslo, 3. mai 1978. ISBN 82-577-0065-7. 13 pp.

\*

Skulberg, O.M. (1980): Noen observasjoner av alger med masseforekomst i vegetasjonsperioden 1979. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1979, Oslo. pp. 19-25.

Skulberg, O.M. (1980): Blue-green algae in Lake Mjøsa and other Norwegian lakes. *Progress in Water Technology* 12 (2): 121-141.

\*

Skulberg, O.M. (1981): Når innsjøer og elver blir overgjødslet - kulturbetinget eutrofiering og algevekst. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1980, Oslo. pp. 23-30.

\*

Berglind, L., Holtan, H. and Skulberg, O.M. (1983): Case studies on off-flavours in some Norwegian lakes. *Water Science and Technology* 15 (6-7): 199-209.

Berglind, L., Johnsen, I.J., Ormerod, K. and Skulberg, O.M. (1983): Oscillatoria brevis (Kütz.) Gom. and some other especially odouriferous benthic cyanophytes in Norwegian inland waters. *Water Science and Technology* 15 (6-7): 241-246.

Norsk institutt for vannforskning (1983): Vannkvalitetspåvirkning av Mjøsa-Glåma-systemet med lukt- og smaksstoffer 1983. Statlig program for forurensningsovervåking. Rapport 159/84, 0-8000203, Oslo, 10. november 1983. 17 pp.

\*

Næs, H. (1984): Factors influencing the production of geosmin by the cyanobacterium Oscillatoria brevis (Kütz) Gom. Cand. scient.-oppgave i biologi. Universitetet i Oslo. 68 pp.

\*

Næs, H., Aarnes, H., Utkilen, H.C., Nilsen, S. and Skulberg, O.M. (1985): Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the cyanobacterium Oscillatoria brevis (Kütz.) Gom. *Applied and Environmental Microbiology* 49 (6): 1538-1540.

\*

Norsk institutt for vannforskning (1986): Blågrønnalger og påvirkning av vannkvalitet - lukt- og smaksstoffer. Fremdriftsrapport til Statens forurensningstilsyn (SFT). Rapport 0-82087, Oslo, 12. april 1986. 22 pp.

\*

Næs, H. (1987): Factors influencing geosmin production by the cyanobacterium Oscillatoria brevis, and the removal of geosmin and 2-methylisoborneol from drinking water. Dissertation submitted for the dr. scient. degree in plant physiology. University of Oslo, November 1987.

Kristiansen, N.K. (1987): Faktorer som påvirker produksjonen av geosmin hos cyanobakterien Oscillatoria bornetii f. tenuis og actinomyceten Actinomyces, streptomyces Å. Klassifisering av flyktige forbindelser fra 5 cyanobacterieslekter. Cand.scient.-oppgave i biologi, Universitetet i Oslo, 84 pp.

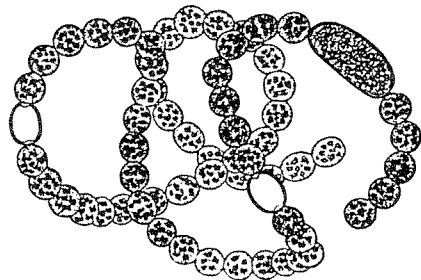
\*

Næs, H., Utkilen, H.C. and Post, A.F. (1988): Factors influencing the production of geosmin in the cyanobacterium Oscillatoria brevis. Water Science and Technology 20, in press.

Vik, E.A., Storhaug, R., Næs, H. and Utkilen, H.C. (1988): Pilot studies for geosmin and 2-methylisoborneol removal. Water Science and Technology 20, in press.

Skulberg, O.M. (1988): Chemical ecology and off-flavour substances. Water Science and Technology 20, in press.

# Blågrønnalger — Nitrogenbinding



## PROBLEMSTILLING

Masseutvikling av blågrønnalger er et karakteristisk fenomen i næringsrikt vann. Det viser seg at blågrønnalgene er såvel årsak til som resultat av eutrofiering. Gjennom sin evne til nitrogenbinding kan blågrønnalgene i stor grad bidra til å gjøre vann fruktbart, og påvirke bl.a. hele eutrofieringsforløpet i vann (ferskvann, brakkvann og saltvann).

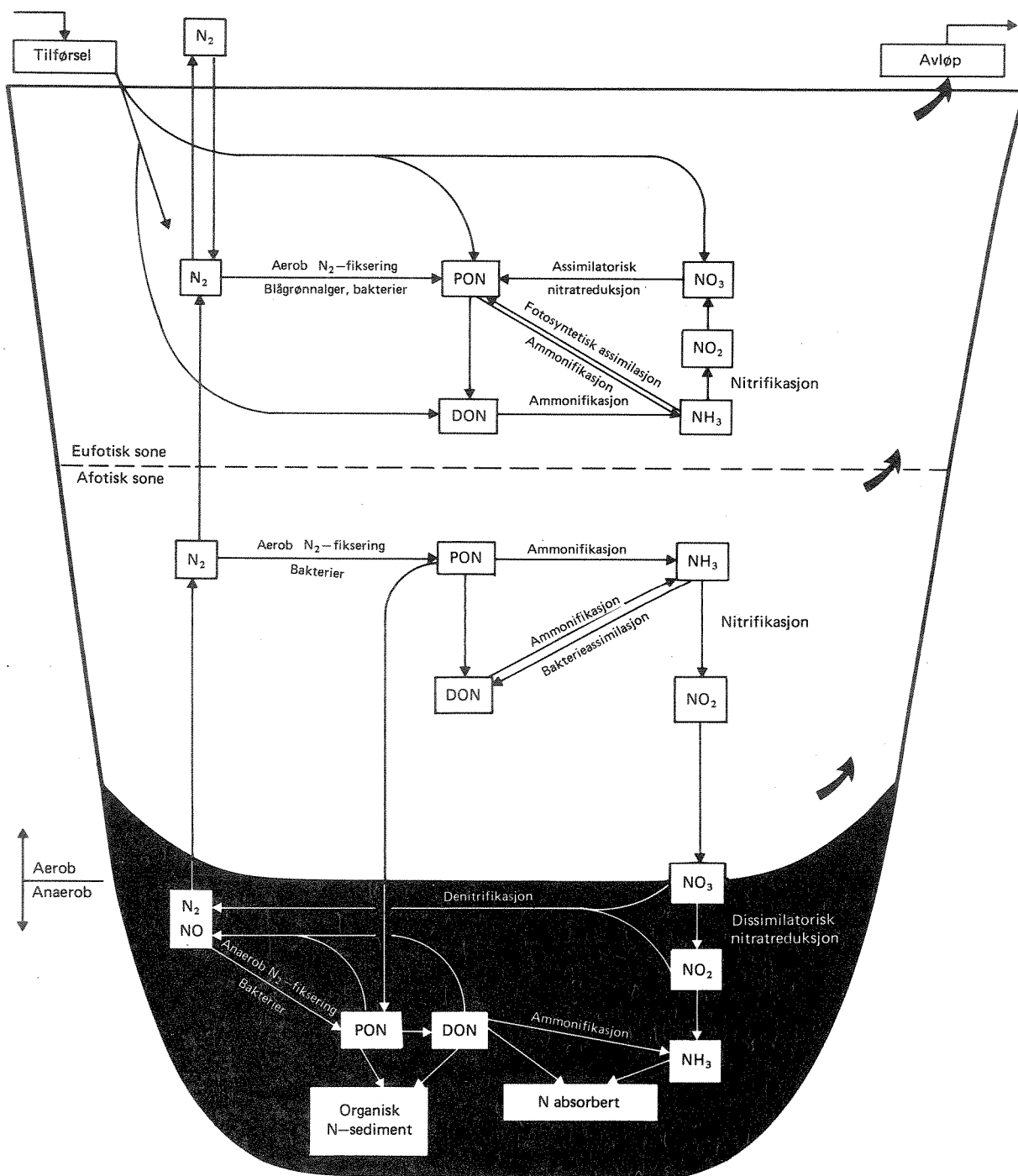
## NITROGENKRETSLØPET

I vann finnes flere former for nitrogenforbindelser. Foruten løst nitrogen ( $N_2$ ), er det uorganiske stoffer som ammonium ( $NH_4^+$ ), nitritt ( $NO_2^-$ ) og nitrat ( $NO_3^-$ ). Av organiske nitrogenforbindelser er det en rekke typer, både i løst (DON) og partikulær form (PON) (Wetzel 1982; Stumm et al. 1981). I nitrogenets kretsløp (Figur 23) inntar ammonium en sentral plass. Det er et nedbrytningsprodukt bl.a. av proteiner og aminosyrer.

Ammonium blir gjennom mikrobiologiske prosesser (nitrifikasjon) oksydert til nitritt og nitrat. Ammonium og nitrat er nitrogenkilder for plantene, og blir tatt opp i organismene og assimilert. Under betingelser med oksygenmangel (anoksisk miljø) vil nitrat kunne omdannes til fritt nitrogen (denitrifikasjon). Nitrat benyttes da av mikroorganismer som oksygenkilde.

Ved hjelp av lys og kjemisk energi kan primærprodusentene (autotrofe organismer) gjennom flere trinn bygge opp energirike organiske stoffer av energifattige nitrogenforbindelser. Dyr - og andre heterotrofe organismer - nyttiggjør disse energirike stoffer til sin vekst og utvikling (livsprosessene) og skiller ut energifattige stoffer til omgivelsene (mineralisasjon).

Bare noen prokaryoter er i stand til direkte å nyttiggjøre molekylært nitrogen i sitt stoffskifte. Disse organismene - enkelte arter bakterier (ca. 60 stammer påvist) og blågrønnalger (ca. 125 stammer påvist) - er til dels frittlevende, til dels inngår de i symbiose med andre organismer. De kan overføre det reaksjonstrege molekylære nitrogen til organiske forbindelser, og dermed danne utgangspunkt for videre biologisk aktivitet.



Figur 23. Nitrogenets kretsløp i en vannforekomst.  
 (Etter Steinberg and Melzer 1984, modifisert).  
 Forklaring se tekst.

I tabell 14 er det gitt en skjematisk oversikt med eksempler på nitrogenbindende organismer.

Tabell 14. Eksempler på noen nitrogenbindende organismer

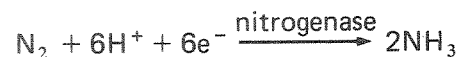
<u>1. Frittlevende organismer med nitrogenbinding</u>	
Archaeobakterier	<u>Methanosarcina</u>
Anaerobe bakterier	<u>Clostridium</u>
Fakultativt anaerobe bakterier	<u>Klebsiella</u>
Mikroaerobe bakterier	<u>Arthrobacter</u>
Aerobe bakterier	<u>Azotobacter</u>
Fotosyntetiske bakterier	<u>Chromatium</u>
Blågrønnalger	<u>Anabaena</u>
<u>2. Symbiotiske organismer med nitrogenbinding</u>	
<u>Rhizobium</u> - erteplanter	<u>Trifolium</u>
Actinomyceter - trær	<u>Alnus</u>
Blågrønnalger - gymnospermer	<u>Cycas</u>
Blågrønnalger - angiospermer	<u>Gunnera</u>
Blågrønnalger - bregner	<u>Azolla</u>
Blågrønnalger - moser	<u>Anthoceros</u>
Blågrønnalger - sopp (lav)	<u>Collema</u>

Det er foretatt beregninger av nitrogenbindingsprosessens globale betydning. Av dette fremgår en årlig biologisk nitrogenbinding som tilsvarer  $175 \cdot 10^6$  tonn nitrogen. Til sammenlikning kan nevnes at industriproduserte nitrogenforbindelser (kjemisk bundet gjennom Haber-Bosch-prosessen) utgjør  $40 \cdot 10^6$  tonn nitrogen (Schlegel 1985). Nitrogenbinding ved mikrobiologisk aktivitet er essensiell for hele biosfærens nitrogenstatus. Det er imidlertid vanskelig å måle bidraget av nitrogenbinding i den årlige nitrogenomsetning, spesielt fordi denitrifikasjon løper parallelt.

## NITROGENBINDING SOM FENOMEN

I naturen foregår nitrogenbinding på mange lokaliteter i jord, ferskvann og saltvann. Det var mikrobiologene S. Winogradsky (1856-1953) og M.W. Beijerinck (1851-1931) som først påviste at atmosfærisk nitrogen kunne bli nyttiggjort direkte av noen organismer til syntese av celledsubstans. Etterhvert ble det klarlagt at prosessen enten foregikk i organismer som levde fritt i miljøet, eller i organismer som levde under spesielle symbioseforhold. Det er særlig i den sistnevnte sammenheng at det gjør seg gjeldende stor effektivitet i nitrogenbinding (Alexander 1984). Ikke-symbiotisk nitrogenbinding finner sted i organismer i plankton og benthos (Figur 24). I akvatiske lokaliteter er det i disse organismesamfunn den mest omfattende nitrogenbinding foregår (Granhall 1978).

Kjemisk består den biologiske nitrogenbinding i at elementært nitrogen blir redusert til ammoniakk. Dette finner sted ved hjelp av en katalytisk reaksjon gjennom enzymsystemet nitrogenase:

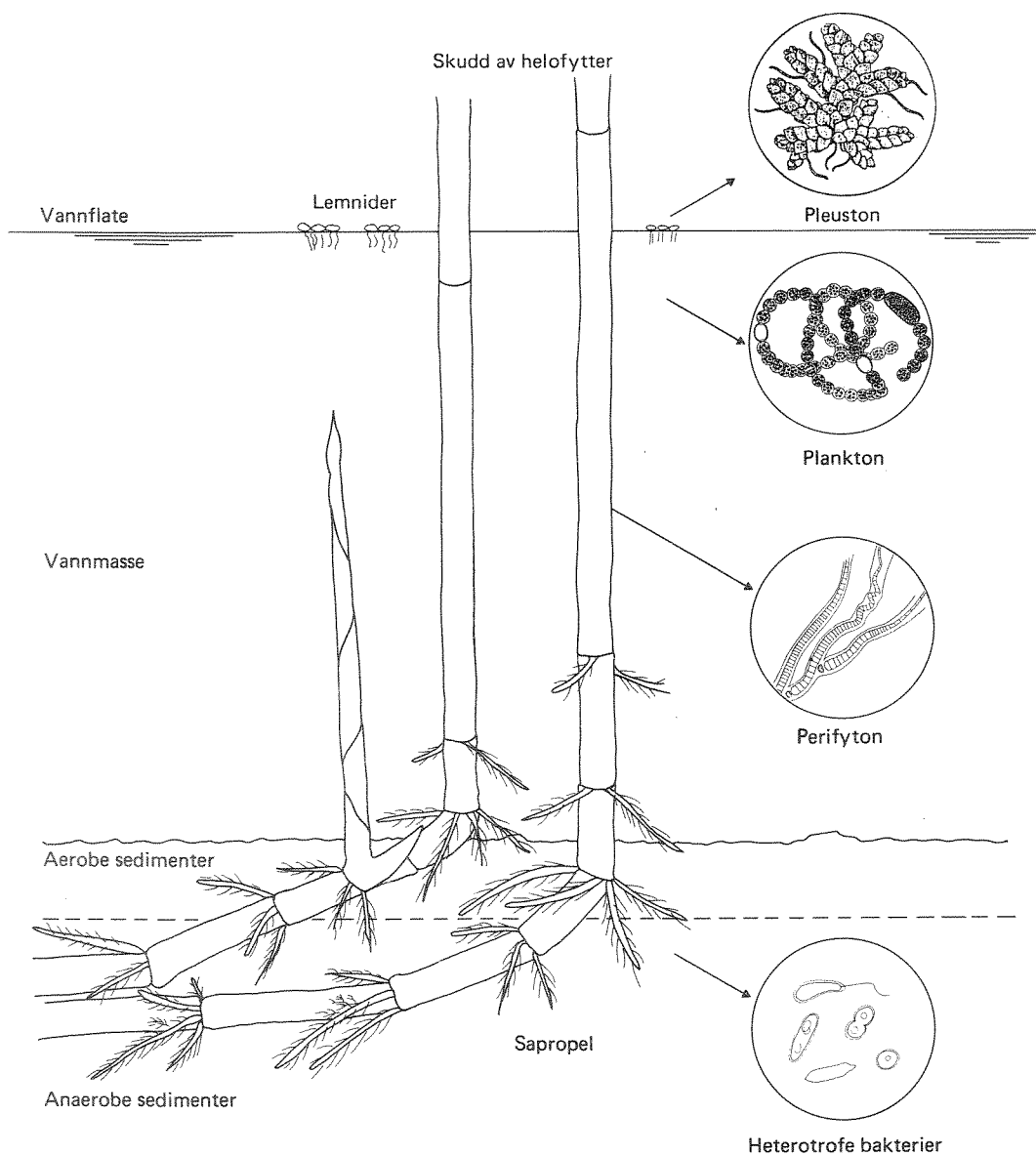


Reaksjonen forutsetter et reduksjonsmiddel (ferredoxin eller flavodoxin), magnesiumioner samt stor tilgang på metabolisk energi (adenosin-trifosfat - ATP). For hvert molekyl nitrogen som reduseres, forbrukes 12-15 molekyler ATP. I Figur 25 er den skjematiske versjon av prosessen som foregår fremstilt.

Nitrogenbinding kan bare gjennomføres av organismer med evne til å syntetisere nitrogenase. Dette enzym er meget følsomt for fritt oksygen, og kan bare virke under anaerobe forhold. Blir enzymet utsatt for luft vil det f.eks. ødelegges.

De prokaryote organismer med nitrogenbinding ble utviklet i jordens anoksiske tidsperiode (Walker 1987). Etter hvert som bl.a. blågrønnalgenes fotosyntese gjorde at oksygeninnholdet i atmosfæren økte til dagens nivå, ble nitrogenbindende organismer innskrenket til å leve i anaerobe miljøer, eller det utviklet seg arter med spesielle strukturer for å beskytte nitrogenase mot inaktivering. Hos blågrønnalgene finnes f.eks. de karakteristiske heterocyster som gir fysiologiske forutsetninger for nitrogenbinding under ordinære voksestedsbetingelser.





Figur 24. Organismesamfunn med nitrogenbinding.

Pleuston, organismesamfunn knyttet til vannoverflaten.

Perifyton, mikroflora av begroingsorganismer.

Sapropel, råtnende slam.

Vanlige vegetative celler hos de aktuelle arter blågrønnalger kan omdannes gradvis til heterocyster under forhold med nitrogen som begrensende faktor. Denne omdannelse er fulgt av en serie med forandringer både strukturelt og biokjemisk (Fogg et al. 1973). Reservestoffer mobiliseres, cytoplasmamembraner reorganiseres, nye proteiner blir produsert, det lages beskyttende strukturer rundt cellen, og en porekanal med spesiell åpningsanordning til de tilgrensende celler blir dannet.

Fysiologisk viser det seg at bl.a. forholdet mellom karbon og nitrogen (C:N) i blågrønnalger er styrende for utviklingen av heterocyster. Med økende verdier for dette forhold ("nitrogensulting"), setter det inn en raskere differensiering av vegetative celler til heterocyster. Omkring halvparten av den vegetative cellens innhold av proteiner brytes ned (protease-aktivitet) under omdannelsen til heterocyster. Nye proteiner blir syntetisert, bl.a. enzymet nitrogenase (Fay 1983). Heterocystene er resultat av en effektiv strukturell tilpasning med beskyttelse av nitrogenase-systemet som muliggjør nitrogenbinding under vekslende atmosfæriske forhold.

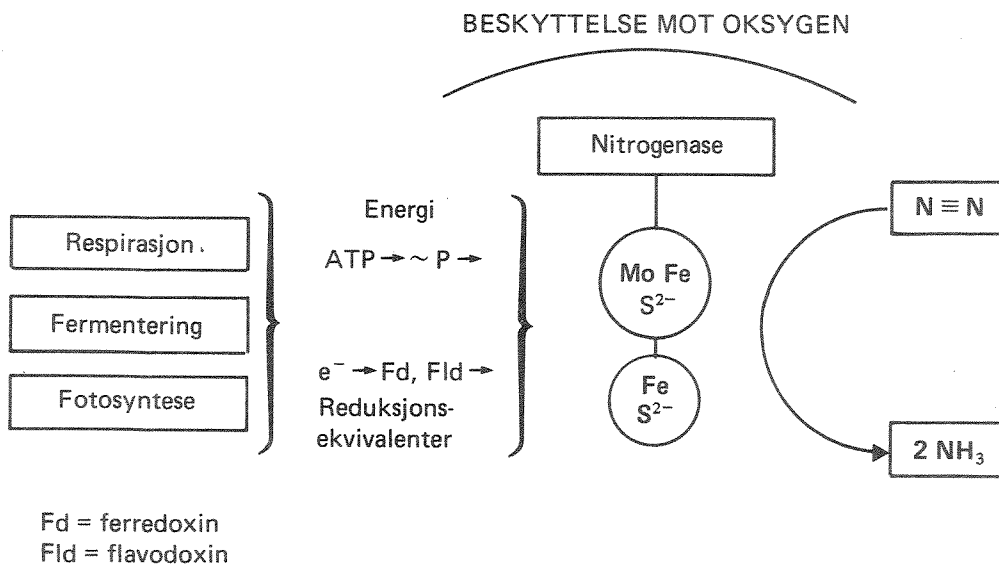


Fig. 25. Skjematisert fremstilling av nitrogenbindingsprosessen (etter Schlegel 1985, forenklet)

Enkelte blågrønnalger som ikke har evnen til å danne heterocyster, har opprettholdt muligheten for nitrogenase-aktivitet. Den første påvisning av nitrogenbinding hos en ikke-heterocystedannende art av blågrønnalger ble gjort med Trichodesmium erythraeum (Goering et al. 1966). Denne marine blågrønnalgen utvikler seg planktisk med ansamlinger av trichomer til fnokker i overflatelaget. I disse fnokkene kan oksygenkonsentrasjonen i cellenes nærmiljø bli så lav at gunstige forhold for nitrogenase-aktivitet blir etablert. Det er etter hvert blitt påvist flere blågrønnalger uten heterocystedannelse som har nitrogenbinding (Tabell 15).

Av størst betydning for nitrogenbinding i en global-økologisk sammenheng er organismegruppen lav (Lichenophyta). De viktigste slekter av blågrønnalger som inngår i lav (phycobionter) er bl.a. Calothrix, Nostoc, Dichothrix, Stigonema og Scytonema. Sammen med blågrønnalgens evne til karbondioksydbinding (fotosyntese), er det nettopp de aktuelle blågrønnalgens nitrogenbinding som har en viktig fysiologisk funksjon i lavens livsutfoldelse. Med tanke på lavenes økologiske nisje, er det lett å trekke forbindelsen til jordens primitive - opprinnelige - vegetasjon.

Foruten blågrønnalger, er det også andre prokaryote organismer som har evne til nitrogenbinding. Enkelte velkjente eksempler kan nevnes for helhetens skyld. Klassen Actinomycetes omfatter gram-positive bakterier med stor utbredelse i naturen (se omtale s. 70). Enkelte actinomyceter lever i symbiose med høyere planter og gjennomfører i spesielle vevsdannelser (f.eks. rotknoller) nitrogenbinding. I norsk flora inngår bl.a. erteplanter, reinrose, tindved, pors og or i symbioser av denne type. (Tabell 14).

De to sistnevnte plantearter har stor betydning for nitrogenhusholdning i landets våtmarksområder. Også frittlevende bakterier - gram-negative - omfatter organismer med nitrogenbinding. I jord og vann er spesielt Azotobacter - gruppen (foruten slekten Azotobacter, også Azomonas og Beijerinckia) grundig studert. De er effektive i sitt stoffskifte, inntil 20 mg nitrogen blir bundet for hvert gram sukker som blir omsatt (Schlegel 1985).

Tabell 15. Oversikt over viktige slekter av blågrønnalger med nitrogenbindende arter.

ORDEN	SLEKTER	
	Uten heterocyster	Med heterocyster
CHROOCOCCALES	Gloeobacter Gloeocapsa Gleoethece Synechocystis	Ordener uten heterocystedannelse
CHAMAESIPHONALES	Chroococciopsis Dermocarpa Dermocarpella	
PLEUROCAPSALES	Myxosarcina Pleurocapsa Xenococcus	
HORMOGONALES	Oscillatoria Phormidium Plectonema Pseudanabaena Trichodesmium	Anabaena Anabaenopsis Aphanizomenon Calothrix Chlorogloeopsis Cylindrospermum Fischerella Nodularia Nostoc Scytonema

## OBSERVASJONER AV NITROGENBINDING

### Metodisk grunnlag

At en organisme nyttiggjør seg elementært nitrogen kan påvises på flere måter. Fra gammelt (1883) har Kjeldahl-analyser vært benyttet i eksperimentell sammenheng. Ved f.eks. å bestemme totalt innhold av bundet nitrogen i organismer og medium - i begynnelse og avslutning - av et kontrollert forsøk, kan nitrogenbinding måles.

Med anvendelse av isotop-teknikk har det vært gjort et betydelig frem-skrutt for undersøkelser av nitrogenbinding. Den vanlige metoden innebærer eksponering av prøven med elementært nitrogen ( $^{14}\text{N}$ ) anriket med

en stabil nitrogenisotop ( $^{15}\text{N}$ ). I den fysiologiske prosessen i organismene kan det ikke skilles mellom disse isotopene. Ved hjelp av massespektrometer etter forsøkets slutt kan mengden av henholdsvis masse 28 ( $^{14}\text{N }^{14}\text{N}$ ) og masse 29 ( $^{14}\text{N }^{15}\text{N}$ ) bestemmes. Denne metoden er meget følsom, samtidig som det ikke er nødvendig på forhånd å kjenne innholdet av nitrogen i utgangsmaterialet (Stewart 1966).

Det er likevel acetylen-reduksjonstesten (Dilworth 1966; Reporter 1985) som har størst praktisk anvendelse innenfor hydrobiologi. Denne fremgangsmåten baserer seg på aktiviteten til nitrogenase-enzymkomplekset som er ansvarlig for biologisk nitrogenbinding. Enzymet nitrogenase reduserer acetylen spesifikt til etylen. Etylen kan bestemmes ved konvensjonell massespektrometri, eller mer hensiktsmessig ved bruk av gass-væskeskromatografi (Postgate 1972). Denne fremgangsmåten benyttes også ved NIVA.

### Felt- og laboratorieundersøkelser

De første kvalitative undersøkelser av nitrogenfiksering i innsjøer i Akershus ble foretatt med prøver fra Bjørkelangen, Holstadvatnet, Årungen og Langen i 1984. Prøvene ble innsamlet 20. september og umiddelbart brakt til laboratoriet.

Flasker (60 ml) ble fylt med 50 ml vannprøve, og gassfasen ble tilsatt 0,5 ml acetylen. Deretter ble flaskene lagt på et vippebord og belyst ovenfra. Etter ca. 1 time ble 100  $\mu\text{l}$  av gassfasen tatt ut og injisert i en gasskromatograf. Forsøket ble utført ved romtemperatur.

Bare prøven fra Langen ga et klart resultat med positiv påvisning av dannelse av etylen, altså nitrogenase-aktivitet i det biologiske materialet. En mikroskopisk undersøkelse viste at det var stor forekomst av en heterocystebærende blågrønnalge i prøven (Anabaena solitaria f. smithii Kom.).

Åtte innsjøer i Akershus ble i 1986 valgt ut til prøvetaking for eventuell påvisning av nitrogenbinding i plankton. Vannprøver og håvtrekkmateriale (planktonhåv, 25  $\mu\text{m}$ ) ble innsamlet 27. august og transportert til laboratoriet. Prøvene ble oppbevart i mørke ved 5  $^{\circ}\text{C}$  i 12 timer før forsøk med nitrogenbinding ble utført.

Den detaljerte fremgangsmåte er beskrevet (NIVA 1988). Acetylen ble tilsatt prøvene. Miljøbetingelsene var 20 $^{\circ}\text{C}$  og homogen belysning, og

inkubasjonstid 3 timer ble benyttet. Kjemisk bestemmelse av acetylen og etylen ble gjort med gasskromatograf (PYE UNICAM 104).

I Tabell 16 er de vannkjemiske forhold i prøvene gjengitt. Resultatene av påvisning av nitrogenbinding er sammenstilt i Tabell 17. Alle de undersøkte innsjøene har eutrof karakter, og frodig utvikling av blågrønnalger er et regelmessig fenomen. På observasjonsdagen ble det påvist aktiv nitrogenbinding i vannprøvene fra Holstadvatnet og Langen. Tilsvarende viste håvtrekkmateriale fra disse to innsjøene, samt Nerevatnet, Gjersjøen og Årungen, positiv nitrogenaseaktivitet. I prøvene fra tre av innsjøene - Sættertjernet, Steinsrudtjernet og Midtsjøvatnet - ble det ikke påvist nitrogenbinding eller nitrogenaseaktivitet.

På dette grunnlag ble innsjøen Langen valgt ut til nærmere undersøkelse. Blågrønnalgen *Anabaena solitaria* f. *smithii* var den dominerende art i vannmassenes plankton. Den hadde trichomer med rikelig dannelse av heterocyster.

Tabell 16. Hydrokjemiske forhold i innsjøene.  
Prøver innsamlet 27.08.1986.

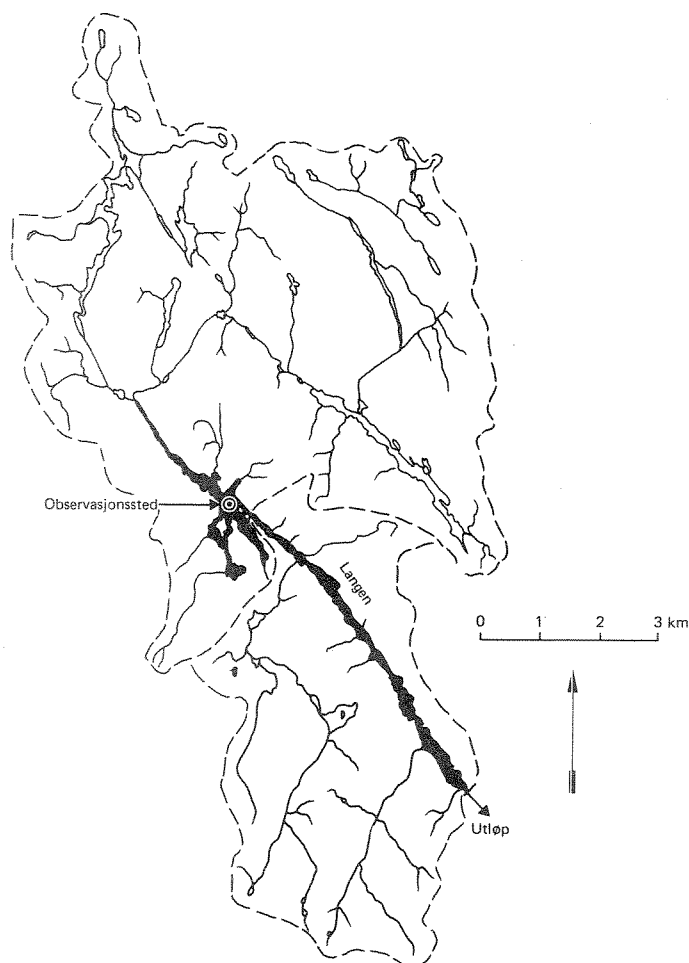
Lokalitet	Tot-N <sub>-1</sub> µg N·l <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup> µg N·l <sup>-1</sup>	Tot-P <sub>-1</sub> µg P·l <sup>-1</sup>	o-PO <sub>4</sub> <sup>-1</sup> µg P·l <sup>-1</sup>	TURB FTU
Holstadvatnet	2948	1	310	23,5	32,0
Gjersjøen	834	410	20	0,5	1,4
Nerevatnet	513	35	30	0,5	3,1
Langen	606	1	24	1,0	5,8
Årungen	2124	760	55	0,5	12,0
Sættertjernet	348	1	12	0,5	0,8
Steinsrudtjernet	366	2	7	0,5	0,6
Midtsjøvatnet	501	2	28	1,0	2,1

Tabell 17. Påvisning av nitrogenbinding. Prøver innsamlet 27.08.1986.

Lokalitet	Etylenproduksj. µmol.l <sup>-1</sup> · time <sup>-1</sup>		Fremtredende blågrønnalge
	Vannprøve	Håvtrekk	
Holstadvatnet	0,007	0,025	<i>Oscillatoria agardhii</i>
Gjersjøen	0	0,067	<i>Oscillatoria agardhii</i> var. <i>isothrix</i>
Nerevatnet	0	0,055	<i>Anabaena solitaria</i> f. <i>smithii</i>
Langen	0,01	0,624	<i>Anabaena solitaria</i> f. <i>smithii</i>
Årungen	0	0,048	<i>Oscillatoria agardhii</i>
Sættertjernet	0	0	( <i>Chroococcus limneticus</i> ) *
Steinsrudtjernet	0	0	( <i>Chroococcus limneticus</i> ) *
Midtsjøvatnet	0	0	( <i>Chroococcus limneticus</i> ) *

\* Blågrønnalger bare i underordnet forekomst i planktonet.

Innsjøen Langen (nedbørfelt 84 km<sup>2</sup>, overflateareal 1,6 km<sup>2</sup>, største målte dyp 18 m) ligger i Hobølelv - Vansjø-vassdraget. Lokaliteten for prøvetaking ved feltundersøkelsen er vist på kartskissen (Figur 26).



Figur 26. Innsjøen Langen (Akershus) med nedbørfelt.  
 Observasjonsstedets beliggenhet: Bredde 59°46'22",  
 lengde 10°55'25".

Observasjonene ble foretatt 5. september 1986. De hydrografiske forhold i innsjøen er fremstilt grafisk i Figur 27. Temperaturkurven viser at sprangsjiktet (metalimnion) lå i området 5,5 - 7,1 m dyp. Ved overflaten var temperaturen 14,3 °C, i 7 m dyp 7,1 °C og i 15 m dyp (dypeste punkt) 4 °C. Det var et raskt avtakende oksygeninnhold i vannmassene gjennom metalimnion. I vannsjiktet fra 7-8 m dyp og ned

til bunnen (epilimnion) var vannmassene fri for oksygen. Målingene av lys (kvantefluks, mikroeinsteint  $m^{-2}s^{-1}$ ) viste at under 2,5 m dyp var lysverdiene mindre enn 1 % av overflatelystet. Under dette nivå har det ikke vært noen fotosynteseaktivitet av betydning (Nicholls 1984).

Det ble innsamlet vannprøver fra femten dyp som ble benyttet til kjemiske analyser. Resultatene er sammenstilt i Tabell 18.

Tabell 18. Langen, Akershus - 05.09.1986. Observasjoner av hydrografiske forhold og nitrogenbinding.

Dyp m	T <sub>0</sub> mp. C	Oksygen <sub>-1</sub> mg O <sub>2</sub> l <sup>-1</sup>	Surhets- grad pH	KOND <sub>-1</sub> mS cm <sup>-1</sup> , 25 C	FARGE <sub>-1</sub> mg Pt l <sup>-1</sup>	TURB FTU	Tot-P <sub>-1</sub> µg P l <sup>-1</sup>	o-PO <sub>4</sub> <sup>-1</sup> µg P l <sup>-1</sup>	Tot-N <sub>-1</sub> µg N l <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup> µg N l <sup>-1</sup>
0	-	-	7,0	43,7	33,7	6,6	31,5	2,5	693	4
0,2	14,3	10,7	7,1	44,5	31,6	7,2	20,5	2,5	630	4
0,5	14,1	10,7	7,0	44,7	31,0	7,2	20,0	2,5	656	4
1,5	14,0	10,7	7,0	44,3	32,0	7,1	21,0	2,0	668	4
2,5	14,0	10,4	7,0	44,3	32,4	7,4	21,5	2,0	681	2
3,5	13,3	7,2	7,0	46,0	32,4	6,2	18,0	2,5	612	19
4,5	-	6,0	6,9	49,6	34,7	3,4	17,5	3,0	599	97
5,5	11,8	1,6	6,8	51,6	38,6	2,1	17,5	4,0	618	159
6,0	10,4	0	6,7	48,6	43,5	2,2	21,5	6,0	605	167
7,0	7,8	0	6,6	42,7	53,2	3,1	22,5	7,0	506	159
8,0	7,1	0	6,6	42,1	60,1	3,7	20,0	7,0	506	193
10,0	6,8	0	6,5	42,9	65,3	3,8	20,5	7,5	494	177
12,0	-	0	6,6	47,8	82,3	4,2	22,0	3,5	593	-
14,0	4,8	0	6,8	54,3	115	4,8	28,0	6,5	1067	11
15,0	4,8	0	6,7	54,8	94,4	4,6	29,5	6,5	1133	9

Dyp m	Klorid <sub>-1</sub> mg Cl l <sup>-1</sup>	Sulfat <sub>-1</sub> mg SO <sub>4</sub> l <sup>-1</sup>	N-binding <sub>-1</sub> µmol C H <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> time <sup>-1</sup>
0	3,9	9,9	0,039
0,2	3,9	9,7	0,018
0,5	3,9	9,4	0,025
1,5	3,9	9,7	0,028
2,5	3,9	9,5	0,039
3,5	4,0	9,1	0,014
4,5	4,1	9,7	0,014
5,5	4,2	9,8	0
6,0	4,0	8,5	-
7,0	3,6	7,6	-
8,0	3,5	7,1	-
10,0	3,7	8,0	-
12,0	4,0	7,2	-
14,0	4,2	5,6	-
15,0	4,2	5,8	-



Vannmassene viste kjemiske egenskaper som karakteristiske for eutrofe innsjøer påvirket av humus. De observerte forhold knyttet til fosfor-, nitrogen- og svovelforbindelser gir klare holdepunkter for at en betydelig mikrobiologisk aktivitet fant sted.

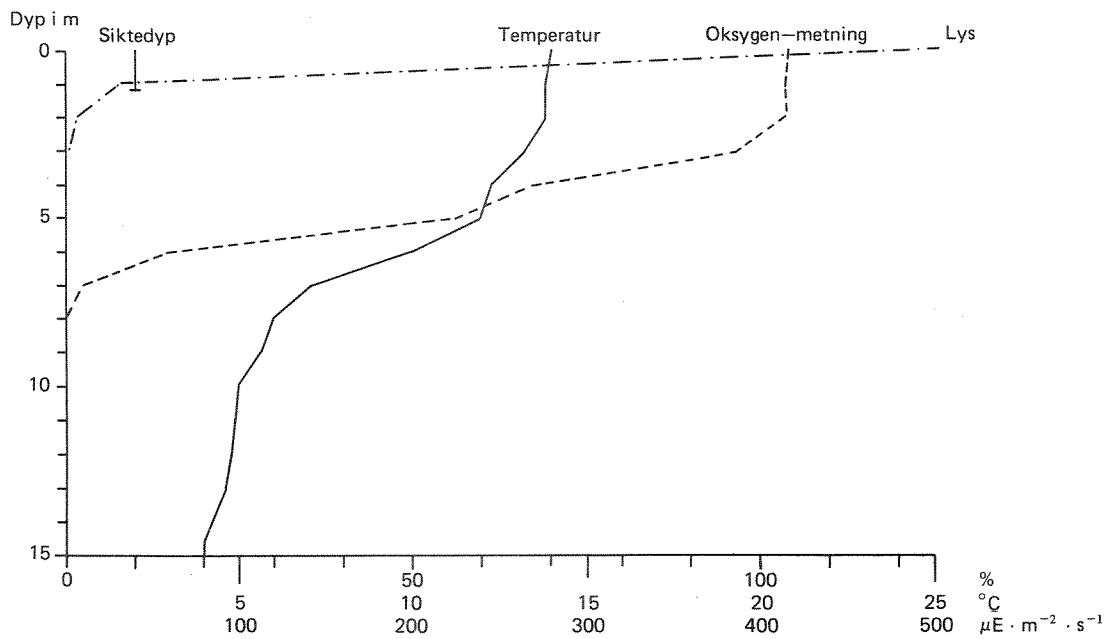
Det ble foretatt målinger av nitrogenbinding i Langen i femten prøvedyp. Prøvene ble inkubert i respektive dyp i 3 timer (kl. 10-13). Ved prøvetidens slutt tilsettes  $8 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ , og pH innstilles på 1 for å stoppe nitrogenase-aktiviteten. Det kjemiske analysearbeid utføres i laboratoriet. Resultatene er samlet i Tabell 18, og de er grafisk fremstilt i Figur 28. Nitrogenbinding ble påvist i overflatelaget (epilimnion). Kurven for nitrogenbinding viser et typisk maksimum i 2,5 m dyp (verdi  $0,039 \mu\text{mol etylen}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{time}^{-1}$ ). Fra 5,5 m dyp og i vannmassene under dette dyp ble det ikke konstatert nitrogenbinding. Resultatene kan sammenholdes med vannmassenes kjemiske tilstand. Forholdet total N : total P var større enn 20 i alle dyp (22,0 - 38,4). Dette skulle ikke indikere noen direkte nitrogenbegrensning for planktonalgene (Claesson 1978). Det er likevel typisk at spesielt lave konsentrasjoner av nitrat (i området  $2\text{-}4 \mu\text{g NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ble målt i epilimnion. Forholdet  $\text{NO}_3^- : \text{PO}_4^{--}$  viser seg å være en god beskrivende parameter. Det laveste forholdstall ble nettopp funnet for prøvedyp 2,5 m hvor nitrogenbindingen var av størst intensitet (Tabell 19). Temperatur og lysforhold tatt i betraktning (Figur 27), tilsier resultatene at det ikke var optimale forutsetninger for nitrogenbinding (Brown and Johnson 1977) i Langen på observasjonsdagen.

Tabell 19. Forholdet mellom nitrogen- og fosforforbindelser i Langens vannmasser. Prøvetaking 05.09.1986.

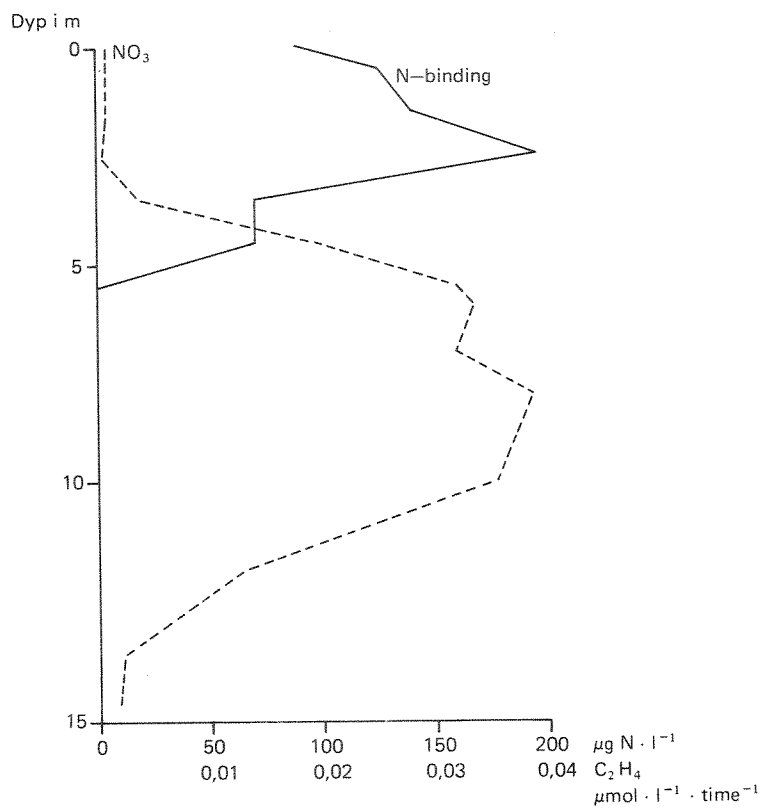
Dyp m	0	0,2	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5	6,0	7,0	8,0	10,0	12,0	14,0	15,0
a	22,0	30,7	32,8	31,8	31,7	34,0	34,2	35,2	28,1	22,5	25,3	24,1	27,0	38,1	38,4
b	1,6	1,6	1,6	2,0	1,0	7,6	32,3	39,8	27,8	22,7	27,6	23,6	3,1	1,7	1,4

a Forholdet mellom TotN og TotP

b Forholdet mellom  $\text{NO}_3^-$  og  $\text{PO}_4^{--}$



Figur 27. Hydrografiske forhold i Langen.  
Siktedyp med Secchi-skive, temperatur, oksygenmetning og lysforhold. Prøvetaking 05.09.1986.



Figur 28. Feltobservasjoner av nitrogenbinding i Langen.  
Målinger utført 05.09.1986.

### Et regneeksempel på årlig nitrogenbinding

Det er selvsagt nødvendig med mange observasjoner for å beskrive variasjoner i tid, dyp og sted av den biologiske prosessen med nitrogenbinding. Likevel kan det være av interesse å gjøre en betraktning av omfanget til prosessen ut fra de foreliggende observasjoner og noen hypotetiske forutsetninger.

Vi velger følgende utgangspunkt:

- Nitrogenbinding foregår 14 timer i 150 døgn.
- Ved binding av 1 mol N reduseres 3 mol acetylen.
- Observasjonsstedets forhold er representativ for hele innsjøen.

Med disse forutsetninger - og nødvendige forbehold - vil den årlige nitrogenbinding i Langen tilsvare  $1,4 \text{ g N} \cdot \text{m}^{-2}$ . Langens overflate er  $1,6 \text{ km}^2$ . Innsjøens nitrogenbinding i de frie vannmasser vil da være  $2,24 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{år}^{-1}$  (ca. 2,24 tonn N pr. år).

Dette vil eventuelt tilsi verdier av samme størrelsesorden for nitrogenbinding som målt i flere tempererte innsjøer med boreal beliggenhet (Granhall 1978). Også i Oslofjorden er det registrert nitrogenbinding i tilsvarende intensitet (Wärmling 1973).

Biologisk binding av nitrogen har imidlertid ikke bare betydning som en kilde for nitrogentilførsel til organismelivet i vann. Samtidig dannes utgangspunkt for - eller katalyseres - viktige økologiske forløp knyttet til lokaliteten (Granhall 1981).

### **BLÅGRØNNALGENES NITROGENBINDING OG PRAKTISK VANNRESSURSFORVALTNING**

Nitrogenbinding er en biologisk prosess av vesentlig betydning for stoffskiftet i ferskvann, brakkevann og saltvann. I sammenheng med vannressursforvaltning vil det også være nødvendig å kjenne til nitrogenbindingen i våtmarksområder og terrestriske systemer med avrenning til aktuelle vannforekomster. Blågrønnalgenes rolle er særlig stor i forbindelse med nitrogenbinding i benthos og plankton. Det samme gjelder for blågrønnalgevegetasjon i jord.

I ferskvann har det lenge vært kjent at blågrønnalgene betyr mye for nitrogenstoffskiftet (Hutchinson 1975). Det er en rekke undersøkelser som er utført for å måle omfanget av nitrogenbinding. Resultatene viser store variasjoner med hensyn til intensitet og økologisk

betydning av prosessen. I oligotrofe vannforekomster innebærer gjerne nitrogenbinding en vesentlig tilførsel av nitrogen til organismelivet. Med økende eutrofiering tiltar betydningen av blågrønnalgenes nitrogenbinding. Prosessens overordnede viktighet i naturen er gjerne relativt økende mot polare områder og med høyden over havet (Kostyaev 1986). Det er vanskelig å angi omfanget (kvantitet) av bidraget med nitrogen til ulike ferskvannsystemer. For innsjøer i nordlige geografiske områder kan nitrogenbinding utgjøre 10-80 % av lokalitetens nitrogentilførsel (Kostyaev 1986). I Norge er imidlertid disse forhold ennå ikke studert.

I brakkvann er det flere arter av de heterocystebærende slektene Nodularia, Anabaena og Aphanizomenon som er velkjente nitrogenbindere. For Østersjøens vedkommende er det f.eks. gjort tildels omfattende undersøkelser av prosessens betydning i eutrofieringsammenheng. Det er spesielt i de mer næringsrike sjøområder at nitrogenbinding foregår i stor utstrekning (f.eks. Finskebukta, Baltiske kystområder). Her utgjør nitrogenbinding  $300-1000 \text{ kg} \cdot \text{km}^{-2} \cdot 3 \text{ måneder}^{-1}$ . Det innebærer da at nitrogenbinding tilfører Østersjøen like mye nitrogen som bidraget gjennom tilløpselver og fra tilgrensende landområder (Melvasalo and Niemi 1985).

I havet og andre marine områder kan også nitrogenbinding være betydningsfull. Nyere undersøkelser (El Hag 1986) tyder på at blågrønnalgene utgjør en større andel av organismelivet i havet enn hittil regnet med (kfr. pikoplankton). I tropiske og subtropiske områder er arter av slekten Trichodesmium viktige i plankton (Humm and Wicks 1980). En betydelig aktivitet med nitrogenbinding finner sted i dette planktonsamfunnet. I tempererte og polare sjøområder er blågrønnalger vanlige i littorale og supralittorale begroinger. Arter med nitrogenbinding omfatter bl.a. slektene Anabaena, Calothrix, Nostoc og Scytonema. Spesielt er slekten Calothrix viktig som dominerende epilittisk alge i tidevannssoner over store geografiske områder. På samme måte som i ferskvann er det betydelige variasjoner i intensitet og omfang av nitrogenbindingsprosessen. Årstidsvekslinger gjør seg også betydelig gjeldende. Optimumstemperaturen for prosessen er omlag  $20^{\circ}\text{C}$ , men nitrogenbinding kan gjennomføres helt ned til  $0^{\circ}\text{C}$ . Heller ikke for marine blågrønnalger er nitrogenbindingsprosessen nevneverdig studert i Norge (Wärmling 1973).

Av de vesentlige stoffkretsløp i biosfæren er nitrogenkretsløpet kanskje det mest interessante, det mest sammensatte og minst forståtte. Nitrogenkretsløpet er hovedsakelig et biokjemisk fenomen som bl.a.

er nøye knyttet til akvatisk organisk produksjon. Den store oppmerksomhet som kulturbetinget eutrofiering har fått, medfører nå fornyet behov for forskningsaktivitet om nitrogenkretsløpet. Blågrønnalgenes rolle er sentral i denne sammenheng.

Sammenfattende kan det understrekes at såvel prosessen nitrogenbinding som dens betydning for vannforekomstene praktisk talt ennå ikke er undersøkt her i landet.

#### **BLÅGRØNNALGER – NITROGENBINDING. NORSKE RAPPORTER OG PUBLIKASJONER**

\*

Wärmling, P. (1973): Nitrogen fixation on rocks in Oslofjord. *Botanica Marina* 16: 237-240.

\*

Skulberg, O.M. (1980): Nitrogen som begrensende faktor i ferskvann og saltvann. *Vann* 15 (1): 8-20.

Skulberg, O.M. (1980): Nitrogen som begrensende faktor for algevekst. Bidrag til en avklaring om nitrogenets rolle i eutrofisammenheng. ISBN 82-7224-152-8, Blindern.

\*

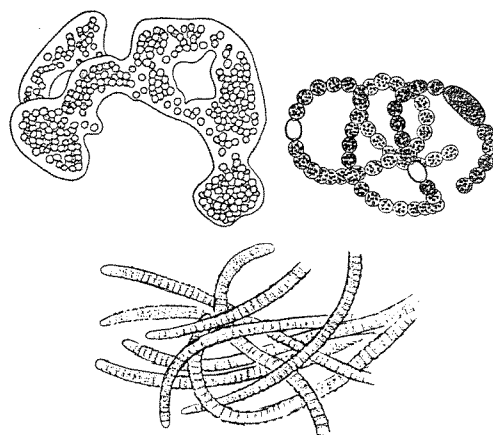
Paasche, E. og Erga, S.R. (1987): Næringsalter og planktonvekst i Oslofjorden. *Vann* 22 (2): 199-206.

Kristiansen, S. (1987): Omsetning av nitrogen i marint plankton. Avhandling, Biologisk institutt, Universitetet i Oslo. Februar 1987.

\*

Norsk institutt for vannforskning (1988): Innledende undersøkelser av nitrogenbinding i norske innsjøer. Rapport 0-87006, under utarbeidelse.

# Henvisninger



## HENVISNINGER

- Abelson, P.H. (ed.) (1984): Biotechnology and biological frontiers. The American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C. 516 pp.
- Alexander, M. (ed.) (1984): Biological nitrogen fixation. Ecology, technology and physiology. Plenum Press, New York. 247 pp.
- Anderson, D.M., White, A.W. and Baden, D.G. (eds.) (1985): Toxic dinoflagellates. Proceedings of the third international conference on toxic dinoflagellates, Canada. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 561 pp.
- Berg, K., Skulberg, O.M. and Skulberg, R. (1987a): Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality - a laboratory study. Arch. Hydrobiol. 108 (4): 549-563.
- Berg, K., Carmichael, W.W., Skulberg, O.M., Benestad, Chr. and Underdal, B. (1987b): Investigation of a toxic water bloom of Microcystis aeruginosa (Cyanophyceae) in Lake Akersvatn, Norway. Hydrobiologia, 144: 97-103.
- Berg, K., Skulberg, O.M., Skulberg, R., Underdal, B. and Willén, T. (1986): Observations of toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in some Scandinavian lakes. Acta vet. scand., 27: 440-452.
- Berglind, L., Holtan, H. and Skulberg, O.M.: (1983a): Case studies on off-flavours in some Norwegian lakes. Wat. Sci. Technol. 15 (6/7): 199-209.
- Berglind, L., Johnsen, I.J., Ormerod, K. and Skulberg, O.M. (1983a): Oscillatoria brevis (Kütz.) Gom. and some other especially odouriferous benthic cyanophytes in Norwegian inland waters. Wat. Sci Technol. 15 (6/7): 241-246.
- Birger, T.I., Malyarevskaya, A.Y. and Arsan, O.M. (1973): Etiology of the Haff (Yuksov-Sartlan) disease. Hidrobiol. Zh. 9 (2): 71-80.
- Braun, C.M. and Johnson, B. (1977): Inorganic nitrogen assimilation in aquatic microorganisms. In: Advances in aquatic microbiology, eds. M.R. Droop and H.W. Jannasch. Volume 1. Academic Press, London. pp. 49-114.

- Brock, T.D. (1973): Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. In: The biology of blue-green algae. Eds. N.G. Carr and B.A. Whitton. Botanical Monographs, 9. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 487-500.
- Campbell, J.M. (1984): Secondary metabolisms and microbial physiology. Adv. Microb. Physiol. 25: 2-57.
- Cardellina, J.H., Manner, F.J., Moore, R.E. (1979): Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. Science 204: 193-195.
- Carmichael, W.W. (ed.) (1981): The water environment. Algal toxins and health. Plenum Press, New York. 491 pp.
- Carmichael, W.W. (1982): Chemical and toxicological studies of the toxic freshwater cyanobacteria Microcystis aeruginosa, Anabaena flos-aquae and Aphanizomenon flos-aquae. S. Afr. J. Sci. 78: 367-372.
- Carmichael, W.W. (1985): Isolation, culture and toxicity testing of toxic freshwater cyanobacteria (blue-green algae). In: Fundamental research in homogenous catalysis. Ed. V. Shilou. Vol. 3. Gordon & Breach, New York. pp. 1249-1262.
- Carmichael, W.W. (1986): Algal toxins. In: Advances in botanical research. Ed. J.A. Callow. Vol. 12. Academic Press, London. pp. 47-101.
- Claesson, A. (1978): Research on recovery of polluted lakes, algal growth potential and the availability of limiting nutrients. Doctoral dissertation. Acta Universitatis Upsaliensis 461. ISBN 91-554-0754-4.
- Codd, G.A. (1984): Toxins of freshwater cyanobacteria. Microbiol. Sci. 1 (2): 48-52.
- Cross, T. (1981): Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. 50: 412-419.
- Dilworth, M. J. (1966): Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta. 127: 285



- El Hag, A.G.D. (1986): Physiological studies on a coccoid marine blue-green alga (Cyanobacterium). *Bo. Phycol. J.* 21: 315-319.
- Eriksson, J.E., Meriluoto, J.A.O. and Lindholm, T. (1988): Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium Oscillatoria agardhii in the freshwater mussel Anodonta cygnea. *Hydrobiologia*. (in press).
- Falconer, J.R., Beresford, A.M. and Runnegar, M.T.C. (1983): Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga Microcystis aeruginosa. *Med. J. Aust.* 1: 511-514.
- Falconer, J.R. and Runnager, M.T.C. (1987): Effects of the peptide toxin from Microcystis aeruginosa on intracellular calcium, pH and membrane integrity in mammalian cells. *Chem.-Biol. Interactions* 63: 215-225.
- Fay, P. (1983): The blue-greens. The Institute of Biology's studies in biology no. 160. Edward Arnold, London. 88 pp.
- Fay, P. and Van Baalen, C. (eds.) (1987): The cyanobacteria. Elsevier, Amsterdam. 543 pp.
- Fogg, G.E. (1965): Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, Madison. 126 pp.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. and Walsby, A.E. (1973): The blue-green algae. Academic Press, London. 459 pp.
- Francis, G. (1878): Poisonous Australian Lake. *Nature*, 18: 11-12.
- Fritsch, F.E. (1952): The structure and reproduction of the algae. Volume II. University Press, Cambridge.
- Geitler, L. (1932): Cyanophyceae. In: L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora, Vierzehnter Band. Akademische Verlagsgesellschaft m.b. H, Leipzig. 1196 pp.
- Van Gemert, L.J. and Nettenbreijer, A.H. (eds.) (1977): Compilation of odour threshold values in air and water. National Institute of Water Supply, Voorburg, The Netherlands and Central Institute for Nutrition and Food Research TNO, Zeist, The Netherlands.

- Gentile, J.H. (1971): Blue-green and green algal toxins. In: Microbial toxins. Eds. S. Kadis, A. Ciegler and S.J. Ajl. Academic Press, New York. pp. 27-66.
- Gerber, N.N. (1983): Volatile substances from actinomycetes: Their role in the odor pollution of water. *Water Sci. Technol.* 15 (6/7): 115-125.
- Goering, J.J., Dugdale, R.C. and Menzel, D.W. (1966): Estimates of in situ rates of nitrogen uptake by Trichodesmium sp. in the tropical Atlantic Ocean. *Limnol. and Oceanogr.* 11: 614-620.
- Golterman, H.L. (1975): *Physiological limnology*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. 489 pp.
- Gorham, P.R. (1964): Toxic algae. In: *Algae and man*, ed. D.F. Jackson. Plenum Press, New York. pp. 307-336.
- Gorham, P.R., McLachlan, J., Hammer, U.T. and Kim, W.K. (1964): Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyngb.) Bréb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 15: 796-804.
- Granhall, U. (ed.) (1978): Environmental role of nitrogen fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. *Ecological Bulletins/NFR* 26, Liber Tryck, Stockholm. 391 pp.
- Granhall, U. (1981): Biological nitrogen fixation in relation to environmental factors and functioning of natural ecosystems. In: *Terrestrial nitrogen cycles*. Eds. F.E. Clark and T. Rosswall. *Ecol. Bull.* 33, Stockholm. pp. 131-144.
- Hashimoto, Y., Kamiya, H., Yamazato, K. and Nozawa, K. (1976): Occurrence of a toxic blue-green alga inducing skin dermatitis in Okinawa. In: *Animal, plant and microbial toxins*. Eds. A. Ohsaka; K. Hayashi, and Y. Sawai. Vol. 1. Plenum Press, New York. pp. 333-338.
- Haugan, B.E., Skulberg, O.M. og Underdal, B. (1982): Giftige alger i drikkevannsforsyninger. - Noen holdepunkter om praktiske tiltak. NIVA-rapport 0-81094, 10. mai 1982. 26 pp.

- Hawkins, P.R., Runnegar, M.T., Jackson, R.B. and Falconer, J.R. (1985): Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (5): 1292-1295.
- Van den Hoek, C. (1978): *Algen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 481 pp.
- Holden, W.S. (ed.) (1970): *Water treatment and examination*. J. & A. Churchill, London. 513 pp.
- Holtan, H. (1979): The Lake Mjøsa story. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 13: 249-258.
- Van den Hondel, C.A.M.J.J., Verbeek, S., van der Ende, A., Weisbeck, P.J., Borrias, W.E. and van Arkel, G.A. (1980): Introduction of transposon Tn 901 into a plasmid of Anacystis nidulans. Preparation for cloning in cyanobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77 (3): 1570-1574.
- Hughes, E.O., Gorham, P.R. and Zehnder, A. (1958): Toxicity of a unialgal culture of Microcystis aeruginosa. *Can. Jour. Microbiol.* 4: 225-236.
- Humm, H.J. and Wicks, S.R. (1980): *Introduction and guide to the marine bluegreen algae*. John Wiley and Sons, New York. 194 pp.
- Hutchinson, G.E. (1975): *A treatise on limnology*. Volume 1, part 2. - Chemistry of lakes. 1015 pp.
- Hübel, H. and Hübel, M. (1980): Nitrogen fixation during blooms of Nodularia in coastal waters and backwaters of the Arkona Sea (Baltic Sea) in 1974. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 65 (6): 793-808.
- Izaguirre, G., Hwang, C.J., Krasner, S.W. and McGuire, M.J. (1982): Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 708-714.
- Jackson, A.R.B., McInnes, A., Falconer, I.R. and Runnegar, M.T.C. (1984): Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga Microcystis aeruginosa. *Vet. Pathol.* 21: 102-113.

- Jantzen, E. and Bryn, K. (1985): Whole-cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria. In: Chemical methods in bacterial systematics. Eds. M. Goodfellow and D.E. Minnikin. Society for Applied Bacteriology, Technical Series 20. Academic Press, London. pp. 145-171.
- Janzen, D.H. (1979): New horizons in the biology of plant defenses. In: Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. Eds. G.A. Rosenthal and D.H. Janzen. Academic Press, New York. pp. 331-350.
- Kato, Y. and Scheuer, P.J. (1975): The aplysiatoxins. Pure Appl. Chem. 41: 1-14.
- Kato, Y. and Scheuer, P.J. (1976): The aplysiatoxins; reactions with acid and oxidants. Pure Appl. Chem. 48: 29-33.
- Keating, K.I. (1977): Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake. Science 196: 885-887.
- Keating, K.I. (1978): Blue-green algal inhibition of diatom growth: Transition from mesotrophic to eutrophic community structure. Science 199: 971-973.
- Kirpenko, Y.A., Sirenko, L.A. and Kirpenko, N.I. (1981): Some aspects concerning remote after-effects of blue-green algae toxin impact on warm-blooded animals. In: The water environment. Algal toxins and health. Ed. W.W. Carmichael. Plenum Press, New York. pp. 257-269.
- Komárek, J. (1958): Die taxonomische Revision der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. In: Algologische Studien. Eds. J. Komárek & H. Ettl. Der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag, pp. 10 - 206.
- Kostyaev, V.Y. (1986): Biology and ecology of nitrogen fixing blue-green algae of fresh waters. YAK 582. 232:581.133:577.472. Moskva. 136 pp.
- Kotai, J., Krogh, T. and Skulberg, O.M. (1978): The fertility of some Norwegian inland waters assayed by algal cultures. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21: 413-436.

- Krishnamurthy, T., Carmichael, W.W., Sarver, E.W. and Skulberg, O.M. (1986): Investigations of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxic peptides. I. Isolation, purification and characterization of peptides from Microcystis aeruginosa and Anabaena flos-aquae. Toxicon 24(9): 865-873.
- Kristiansen, N.K. (1987): Faktorer som påvirker produksjonen av geosmin hos cyanobakterien Oscillatoria bornetii f. tenuis og actinomyceten Actinomyces, streptomyces Å. Klassifisering av flyktige forbindelser fra 5 cyanobacterieslekter. Cand.scient.-oppgave i biologi, Universitetet i Oslo. 84 pp.
- Langeland, G., Hasselgård, T., Tangen, K., Skulberg, O.M. and Hjelle, A. (1984): An outbreak of paralytic shellfish poisoning in western Norway. Sarsia, 69: 185-193.
- Leeuwangh, P., Kappers, F.I., Dekker, M. and Koerselman, W. (1983): Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. Aquat. Toxicol, 4: 63-72.
- Lindstrøm, E.-A., Skulberg, R. and Skulberg, O.M. (1973): Observations on planktonic diatoms in the lake - river system Lake Mjøsa - Lake Øyeren - River Glåma, Norway. Norw. J. Bot. 20 (2/3): 183-195.
- Loomis, T.A. (1978): Essentials of toxicology. Third edition. Lea & Febiger, Philadelphia. 432 pp.
- Malyarevskaya, A.Y., Birger, T.I. and Arsan, O.M. (1970): Alteration in the biochemical composition of the perch (Perca) under the influence of lethal concentrations of Microcystis aeruginosa Kütz. Gidrobiol. Zh. 6 (2): 36-41.
- Mattsson, R. og Willén, T. (1986): Toksinbildande blågröna alger i svenska insjöar 1985. Naturvårdsverket. Rapport 3096. 26 pp.
- May, V. (1981): The occurrence of toxic cyanophyte blooms in Australia. In: The water environment: Algal toxins and health. Ed. W.W. Carmichael. Plenum Press, New York. pp. 127-142.
- Melvasalo, T. and Niemi, Å (1985): The fixation of molecular nitrogen by blue-green algae in the open Baltic Sea. Verh. Internat. Verein. Limnol. 22: 2811-2812.

- Metting, B. and Pyne, J.W. (1986): Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 386-394.
- Michel, S., Gevrey, J. and Wautier, J. (1972): Mise en évidence de la toxicité d'un complexe algal sur la faune aquatique. Note 1: Influence sur certains éléments de la faune benthique et sur quelques espèces de poissons. *Bull. Soc. Sci. Vét. Méd. comp.* 74 (185-191).
- Molisch, H. (1937): *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie.* Fischer, Jena. 106 pp.
- Moore, R.E. (1984): Public health and toxins from marine blue-green algae. In: *Seafood toxins.* Ed. E.P. Ragelis. American Chemical Society Symposium Series 262, Washington, D.C. pp. 369-376.
- Moriarty, F. (1983): *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems.* Academic Press, London.
- Mosher, H.S., Fuhrman, F.A., Buchwald, H.D. and Fischer, H.G. (1964): Tarichatoxin-tetrodotoxin: a potent neurotoxin. *Science* 144: 1100-1110.
- Munro, M., Chemical Department, University of Canterbury, New Zealand - Kjemisk karakterisering av Nodularia-toksinet. Personlig meddelelse 1987.
- Nicholls, M. (1984): Lys, siktedyp, turbiditet, farge. I: *Vassdragsundersøkelser. En metodebok i limnologi.* Red. K. Vennerød. Norsk Limnologforening, Universitetsforlaget, Oslo, pp. 46-57.
- Norsk institutt for vannforskning (1982): *Haldenvassdraget. Vannkvalitet og forurensningsvirkninger. Resultater av vassdragsundersøkelser for Haldenvassdragets vassdragsforbund 1975-1981. Rapport 0-70219, Oslo 15. mars 1982, 179 pp.*
- Norsk institutt for vannforskning (1983): *Vannkvalitetspåvirkning av Mjøsa - Glåma-systemet med lukt- og smaksstoffer 1983. Statlig program for forurensningsovervåking. Rapport 159/84, 0-8000203, Oslo, 10. november 1983. 17 pp.*
- Norsk institutt for vannforskning (1986a): *Giftproduserende blågrønnalger i Vestfold. Resultater av undersøkelser i 1985. Rapport 0-84135. 32 pp.*

- Norsk institutt for vannforskning (1986b): Kontroll av giftproduserende alger - Akersvatnet, Vestfold - Forskningsbehov i Norge. Notat til Miljøverndepartementet 11. november 1986. 10 pp.
- Norsk institutt for vannforskning (1986c): Blågrønnalger og påvirkning av vannkvalitet - lukt- og smaksstoffer. Fremdriftsrapport til Statens forurensningstilsyn (SFT). Rapport 0-82087, Oslo, 12. april 1986. 22 pp.
- Norsk institutt for vannforskning (1988): Innledende undersøkelser av nitrogenbinding i norske innsjøer. Rapport 87006, under utarbeidelse.
- Næs, H., Aarnes, H., Utkilen, H.C., Nilsen, S. and Skulberg, O.M. (1985): Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the cyanobacterium Oscillatoria brevis (Kütz.) Gom. Applied and Environmental Microbiology 49 (6): 1538-1540.
- Næs, H. (1987): Factors influencing geosmin production by the cyanobacterium Oscillatoria brevis, and the removal of geosmin and 2-methylisoborneol from drinking water. Dissertation submitted for the dr. scient. degree in plant physiology. University of Oslo, November 1987.
- Olson, T.A. (1951): Toxic plankton. In: Proceedings of Inservice Training Course in Water Works Problems, University of Michigan, School of Public Health, Ann Arbor. pp. 86-95.
- Palmer, C.M. (1959): Algae in water supplies. Public Health Service Publication No. 657, Cincinnati. 88 pp.
- Persson, P.-E. (1983): Off-flavour in aquatic ecosystems - an introduction. Wat. Sci Technol. 15 (6/7): 1-11.
- Phillips, M.J., Roberts, R.J., Stewart, J.A. and Codd, G.A. (1985): The toxicity of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa to rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish Dis. 8: 339-344.
- Postgate, J.R. (1972): The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In: Methods in microbiology. Eds. J.R. Norris and D.W. Ribbons. Volume 6B, Academic Press, London. pp. 343-356.

- Powers, J.J. (1984): Current practices and application of descriptive methods. In: Sensory analysis of foods. Ed. J.R. Piggott. Elsevier Appl. Sci. Publ., London. pp. 179-242.
- Raschke, R.L. and Schultz, D.A. (1987): The use of the algal growth potential test for data assessment. *Journal WPCF*, 59 (4): 222-227.
- Raziuddin, S., Siegelman, H.W. and Tornabene, T.G. (1983): Lipopolysaccharides of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa. *Eur. J. Biochem.* 137: 333-336.
- Reporter, M. (1985): Nitrogen fixation. In: Techniques in bioproduci-tivity and photosynthesis. Eds. J. Coombs, D.O. Hall, S.P. Long and J.M.O. Scurlock. Pergamon Press, Oxford. pp. 158-164.
- Rice, E.L. (1974): Allelopathy. Academic Press, New York. 387 pp.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microb.* 111: 1-61.
- Rippka, R., Waterbury, J.B. and Stanier, R.Y. (1981): Isolation and purification of cyanobacteria: Some general principles. In: The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin. pp. 212-220.
- Rose, E.T. (1953): Toxic algae in Iowa lakes. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 60: 738-745.
- Rosenthal, G.A. and Bell, E.A. (1979): Naturally occurring, toxic nonprotein amino acids. In: Herbivores. Their interaction with secondary plant metabolites. Eds. G.A. Rosenthal and D.H. Janzen. Academic Press, New York. pp. 353-386.
- Runnegar, M.T.C. and Falconer, J.R. (1981): Isolation, characterization and pathology of the toxin from the blue-green alga Microcystis aeruginosa. In: The water environment: Algal toxins and health. Ed. W.W. Carmichael. Plenum Press. New York pp. 325-342.
- Sakamoto, H., Terada, M., Fujiki, H., Mori, M., Nakayasu, M., Sugimura, T. and Weinstein, I.B. (1981): Stimulation of prostaglandin production and choline turnover in HeLa cells by lyngbya-toxin A and dihydroteleocidin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 (1): 100-107.



- Sasner, J.J. Jr., Ikawa, M. and Foxall, T.L. (1984): Studies on Aphanizomenon and Microcystis toxins. In: Seafood toxins. Ed. E.P. Rangelis. American Chemical Society Symposium Series 262, Washington, D.C. pp. 391-406.
- Schwimmer, D. and Schwimmer, M. (1955): The role of algae and plankton in medicine. Grune & Stratton, New York. 85 pp.
- Schlegel, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 571 pp.
- Sirenko, L.A., Kirpenko, Y.A., Lukina, L.F., Kovalenko, O.V. and Zimovets, L.M. (1976): Toxicity of blue-green algae, the causative agents of the blooming of water. *Gidrobiol. Zh.* 12 (4): 22-28.
- Sivonen, K. (1982): Factors influencing odour production by actinomycetes. *Hydrobiologia* 86: 165-170.
- Sivonen, K., Niemi, M. and Niemelä, S. (1986): The occurrence of toxic cyanobacteria in Finland during 1986. Nordic workshop on toxic cyanophytes. Husö biological station, Åland, 24.-25.9.1986.
- Skulberg, O.M. (1964): Algal problems related to the eutrophication of European water supplies, and a bio-assay method to assess fertilizing influence of pollution on inland waters. In: *Algae and man*. Ed. D.F. Jackson. Plenum Press, New York. pp. 262-299.
- Skulberg, O.M. (1965): Vannblomstdannende blågrønnalger i Norge og deres betydning ved studiet av vannforekomstenes kulturpåvirkning. *Nord. Jordbr. Forsk.*, 47 (3), 180-190.
- Skulberg, O.M. (1967): Gjødslingseffekt på algeutvikling i overflatevann. *Grundföbättring*, 20 (2): 85-90.
- Skulberg, O.M. (1972): Blågrønnalger i norske vannforekomster, mulige konsekvenser av sunnhetsmessig betydning for mennesker og dyr. *Tidsskr. norske Lægeforen.*, 92 (12): 851-854.
- Skulberg, O.M. (1978): Some observations on red-coloured species of Oscillatoria (CYANOPHYCEAE) in nutrient-enriched lakes of southern Norway. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 20: 776-787.

- Skulberg, O.M. (1979): Første tilfelle av Microcystis-forgiftning registrert i Norge. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1978, Oslo, pp. 73-77.
- Skulberg, O.M. (1980): Blue-green algae in Lake Mjøsa and other Norwegian lakes. Progress in Water Technology 12 (2): 121-141.
- Skulberg, O.M. (1981): Når innsjøer og elver blir overgjødset -kultur-betinget eutrofiering og algevekst. Norsk institutt for vannforsknings årbok 1980, Oslo, pp. 23-30.
- Skulberg, O.M. (1983): Allergi og overømfintlighet knyttet til vann. Alger og andre vannorganismer som årsak til problemer. Limnos. 2 (2): 12-14.
- Skulberg, O.M. (1988): Chemical ecology and off-flavour substances. Wat. Sci. Technol. 20, in press.
- Skulberg, O.M., Codd, G.A. and Carmichael, W.W. (1984): Toxic blue-green algal blooms in Europe: A growing problem. Ambio, 13 (4): 244-247.
- Skulberg, O.M. and Lillehammer, A. (1984): Glåma. In: Ecology of European Rivers. Ed. B.A. Whitton. Blackwell Scientific Publications, London. pp. 469-498.
- Skulberg, O.M. and Skulberg, R. (1985): Planktic species of Oscillatoria (Cyanophyceae) from Norway - characterization and classification. Arch. Hydrobiol. Suppl. 71 (1/2): 157-174.
- Solomatina, U.D. and Matchinskaya, S.F. (1972): Alteration of the amino acid content of the ide induced by blue-green algae. Gidrobiol. Zh. 8 (4): 46-49.
- Stangenberg, M. (1968): Toxic effects of Microcystis aeruginosa Kg. extracts on Daphnia longispina O.F. Müller and Eucypris virens Jurine. Hydrobiol. 32: 81-87.
- Statens Institutt for Folkehelse (1987): G2 Kvalitetsnormer for drikkevann. Oslo. 72 pp.
- Staub, R. (1961): Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge Oscillatoria rubescens DC. Schweiz. Z. Hydrol. 23(1): 82-198.

- Steidinger, K.A. (1983): A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. In: Progress in Phycological Research. Eds. Round and Chapman. Vol. 2, Elsevier Science Publishers B.V. pp. 147-188.
- Stein, J.R. (ed.) (1973): Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. University Press, Cambridge. 448 pp.
- Steinberg, C. and Melzer, A. (1984): Stoffkreisläufe in Binnengewässern. In: Limnologie für die Praxis. Grundlagen des Gewässerschutzes. Eds. Besch et al., Landsberg/Lech (ecomed-Verl.) pp. 1-92.
- Štěpánek, M., Biňovec, J., Chalupa, J., Jiřík, V., Schmidt, P. and Zelinka, M.D. (1963): Water blooms in the ČSSR. Scientific Papers, Institute of Chemical Technology, Prague. pp. 175-263.
- Stewart, W.D.P. (1966): Nitrogen fixation in plants. The Athlone Press, University of London. 168 pp.
- Stumm, W. and Morgan, J.J. (1981): Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons, New York. 780 pp.
- Suffet, I.H., Maloney, S.W., Brock, G.L. and Yoke, T.L. (1984): Instituting the flavor profile method and broad spectrum chemical analysis to understand taste and odor problems. American Water Works Association, Water Quality Technology Conference, Denver Co., December 1984, pp. 1-17.
- Sävenhed, R. (1986): Chemical and sensory analysis of off-flavour compounds in drinking water. Linköping Studies in Arts and Science No. 3, ISBN 91-7372-969-8.
- Tangen, K. (1984): Giftige alger. I: Havet omkring Danmark. Danmarks Naturfredningsforenings Forlag, København. pp. 23-31.
- Toerien, D.F., Scott, W.E. and Pitout, M.J. (1976): Microcystis toxins: isolation, identification, implications. Water South Afr. (Pretoria) 2 (4): 160-162.
- VanLandingham, S.L. (1982): Guide to the identification, environmental requirements and pollution tolerance of freshwater blue-green algae (Cyanophyta) United States Environmental Protection Agency, EPA-600/3-82-073, 341 pp.

- Waksman, S.A. (1950): The actinomycetes. Their nature, occurrence, activities, and importance. Waltham, Mass., U.S.A. 230 pp.
- Walker, J.C.G. (1987): Was the Archaen biosphere upside down? *Nature* 329: 710-714.
- Watanabe, M.F. and Oishi, S. (1985): Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (Microcystis aeruginosa) under culture conditions. *Appl. envir. Microbiol.* 49: 1342-1344.
- Weete, J.D., Huang, W.Y. and Laseter, J.L. (1979): Streptomyces sp. - a source of odorous substances in potable water. *Water Air Soil Pollut.* 11: 217-223.
- Wenzel, B.M. (1973): Chemoreception. In: Handbook of perception. Eds. E.C. Carterette and M.P. Friedman. Academic Press, New York. pp. 187-218.
- Wetzel, R.G. (1975): Limnology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 743 pp.
- Van der Westhuizen, A.J., Eloff, J.N. and Krüger, G.H.J. (1986): Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa (UV-006). *Arch. Hydrobiol.* 108 (2): 145-154.
- Whitton, B.A. (1973): Freshwater plankton. In: The biology of blue-green algae. Eds. N.G. Carr and B.A. Whitton. Botanical Monographs. 9 Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 353-367.
- Wieland, T. (1986): Peptides of poisonous Amanita mushrooms. Springer Series in Molecular Biology. Ed. A. Rich. Springer Verlag, Berlin. 256 pp.
- Wood, S., Williams, S.T., White, W.R. and Jones, F. (1983): Factors influencing geosmin production by a streptomycete and their relevance to the occurrence of earthy taints in reservoirs. *Wat. Sci. Technol* 15 (6/7): 191-198.
- World Health Organization (1984): Aquatic (marine and freshwater) biotoxins. Environmental Health Criteria 37. ISBN 92-4-154097-4. Geneve 95 pp.

- Wärmling, P. (1973): Nitrogen fixation on rocks in Oslofjord. *Botanica Marina*, 16: 237-240.
- Zoeteman, B.C.J. and Piet, G.J. (1974): Cause and identification of taste and odour compounds in water. *Sci. Total Environ.* 3: 103-115.
- Zoeteman, B.C.J. (1978): Threshold odour concentrations in water of chemical substances. Rijksinstituut voor drinkwatervoorziening. - Mededeling 74-3, The Hague.
- Østensvik, Ø., Skulberg, O.M. and Søli, N.E. (1981): Toxicity studies with blue-green algae from Norwegian inland waters. In: *The water environment. Algal toxins and health*. Ed. W.W. Carmichael. Plenum Press, New York. pp. 315-324.

# Heterocyste

