



O-88225

Økotoksikologiske  
forsøk (allelopati)  
med algegiftstoffer fra  
***Chrysochromulina polylepis***  
i det marine miljø.

# NIVA – RAPPORT

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

<b>Hovedkontor</b> Postboks 69, Korsvoll 0808 Oslo 8 Telefon (02) 23 52 80 Telefax (02) 39 41 89	<b>Sørlandsavdelingen</b> Televeien 1 4890 Grimstad Telefon (041) 43 033 Telefax (041) 43 033	<b>Østlandsavdelingen</b> Rute 866 2312 Ottestad Telefon (065) 76 752 Telefax (065) 78 402	<b>Vestlandsavdelingen</b> Breiviken 5 5035 Bergen-Sandviken Telefon (05) 95 17 00 Telefax (05) 25 78 90
--	---	--	--

Prosjektnr.: 0-88225
Undernummer:
Løpenummer: 2429
Begrenset distribusjon:

Rapportens tittel:  Økotoksikologiske forsøk (allelopati) med algegiftstoffer fra <u>Chrysochromulina</u> <u>polylepis</u> i det marine miljø.	Dato: 25.4.90
Forfatter (e):  Halvor Hektoen Olav Skulberg Bjørn Olav Rosseland Agnar Kvellestad	Prosjektnummer:
	Faggruppe:  Akvakultur
	Geografisk område:
	Antall sider (inkl. bilag): 21

Oppdragsgiver:  Statens forurensningstilsyn (SFT)	Oppdragsg. ref. (evt. NTNF-nr.):  387/88
---	--

Ekstrakt:  Rapporten gir en sammenfatning av arbeidet med å produsere og ekstrahere toksin av alger <u>Chrysochromulina polylepis</u> samt forsøk med å etablere metoder for påvisning av hemolytisk effekt og toksikologiske effekter på laks. Det gis også en oversikt over forskningsområder som det vil være aktuelt å videreføre.
--

4 emneord, norske:

1. Chrysochromulina polylepis
2. Prymnesium parvum
3. Isolere
4. Toksisitetstester

4 emneord, engelske:

1. Chrysochromulina polylepis
2. Prymnesium parvum
3. Isolation
4. Toxicity tests

Prosjektleder:

  
Halvor Hektoen

For administrasjonen:

  
Bjørn Olav Rosseland

ISBN 82-577-1735-5

NORSK INSTITUTT FOR VANNFORSKNING

0 - 8 8 2 2 5

SFT nr. 387/88

**ØKOTOKSIKOLOGISKE FORSØK (ALLELOPATI) MED ALGEGIFTSTOFFER FRA  
CHRYSOCHROMULINA POLYLEPIS I DET MARINE MILJØ**

Oslo, 10. februar 1990

Halvor Hektoen  
Olav Skulberg  
Bjørn Olav Rosseland  
Agnar Kvellestad

**INNHOLDSFORTEGNELSE**

	<u>Side</u>
Forord .....	3
Bakgrunn .....	4
<u>Prymnesium</u> og dens kultivering .....	5
Produksjon og ekstraksjon av toksin .....	6
Innledende forsøksvirksomhet .....	7
1. Etablering av metoder for å påvise hemolytisk effekt av toksin .....	7
2. Eksperimentelle undersøkelser av giftvirkninger på fisk .....	10
3. Bruk av nye metoder for studier av virkningsmekanismer .....	14
4. Forsøk med kjemisk kontroll av <u>Chrysochromulina polylepis</u> .....	15
Feltvirksomhet .....	16
Informasjon .....	16
Videreføring av forskningsvirksomhet .....	16
Henvisninger .....	19

## FORORD

I juni 1988 ble det innledet drøftelser med SFT om eksperimentelle undersøkelser av virkninger til marine biotoksiner. Problemene med oppblomstringene til Chrysochromulina polylepsis var det praktiske utgangspunkt. Den beslektede fytoflagellaten Prymnesium parvum var en egnet modellorganisme til innledende forsøksvirksomhet. Det ble derfor enighet om å starte opp sammenliknende studier av disse organismene og deres toksiner.

Ved NIVA har flere medarbeidere vært bidragsyttere til forskningsvirksomheten. Dette gjelder Halvor Hektoen, Olav Skulberg, Bjørn Olav Rosseland, Jozsef Kotai, Lasse Berglind, Stein Johansen og Randi Skulberg.

Prosjektet er gjennomført i nær kontakt med Universitetet i Oslo, Universitetet i Bergen, Havforskningsinstituttet, Statens institutt for folkehelse, Norges veterinærhøgskole og Veterinærinstituttet. Vi takker for godt samarbeid.

Oslo, 10.2.1990

Bjørn Olav Rosseland

## BAKGRUNN

Masseoppblomstringen av algen Chrysochromulina polylepsis i Nordsjøen og norske kystfarvann i mai og juni, 1988 medførte skadevirkninger på oppdrettsfisk, strandnær fisk, virvelløse dyr og fastsittende alger på hardbunn. Virkningen strakte seg fra Sveriges vestkyst til sør for Bømlo på Sør-Vestlandet. Tidlige undersøkelser i samarbeid mellom Norsk institutt for vannforskning (NIVA) og Norges veterinærhøgskole viste at stoffer produsert av algen var giftig. Giftstoffet viste seg å ha en komplisert opprinnelse, og syntes også å ha flere systemiske virkninger. Bl.a. ble det observert skader på cellemembraner til røde blodceller som medførte hemolyse. Det ble også rapportert om virkninger på fisks osmoregulering som medførte økt innhold av plasmaioner og dødelighet.

Internasjonalt har giftproduserende alger vært et problem for akvakultur i en årrekke. I damoppdrett i Israel har en f.eks. hatt problemer med flagellaten Prymnesium parvum som produserer giftstoffet prymnesin. Dette toksinet synes å ha lignende egenskaper og være i "samme gruppe" som Chrysochromulina-toksinet. I disse anleggene er det blitt brukt ulike kjemiske forbindelser som både dreper algen og reduserer giftvirkningen.

Renfremstilt prymnesin kunne skaffes tilveie som et handelspreparat. NIVA ønsket derfor å studere virkninger av dette toksinet og innøve forskningsmetoder (økotoksikologiske metoder) for algetoksiner som ville være egnet for å studere effekter av Chrysochromulina-toksinet.

Ved NIVAs marinbiologiske stasjon på Solbergstrand er det innredet et eget våtromslaboratorium for toksisitetsundersøkelser. Ved NIVAs laboratorie i Oslo er det fasiliteter for isolering og dyrking av alger.

Tilrettelegging og innledende forsøksvirksomhet ble foretatt høsten 1988. I dette inngikk anskaffelse av toksinproduserende stammer av alger og toksiner til utprøving (bl.a. prymnesin, Zigma).

I desember 1988 bevilget SFT midler til eksperimentelle studier av toksikologiske forhold knyttet til marine organismer. I denne rapporten behandles resultater og erfaringer som er fremkommet av forskningsvirksomheten i 1989.

## PRYMNESIUM OG DENS KULTIVERING

Den euryhaline fytoflagellat Prymnesium parvum Carter er vidt utbredt i brakkvann og saltvann over hele kloden. Massedød av fisk er rapportert fra mange land i forbindelse med oppblomstringer. Et betydelig internasjonalt forskningsarbeid er nedlagt i karakterisering av algen og undersøkelser av de aktuelle toksiner (Ulitzur 1965, Shilo 1981). Det var derfor hensiktsmessig å velge Prymnesium parvum som en modellorganisme i forbindelse med utforskningen av Chrysochromulina polylepsis og dens giftvirkninger (Underdal et al. 1989). Sammenliknende studier av de to fytoflagellatene ble derfor påbegynt.

Prymnesium parvum regnes til familien Prymnesiaceae i ordenen Prymnesiales av klassen Haptophyceae. Det er beskrevet 4 arter av Prymnesium i vårt geografiske område (Starmach 1985). Fylogenetisk står disse nær til Chrysochromulina, og de er også i store trekk morfologisk lik hverandre. For en rask bestemmelse er bl.a. forskjeller i lengde av haptonema, og organiske skjell på celleoverflaten viktige karakterer:

- Prymnesium, med kort haptonema, ikke sammentrekkbar, og med organiske skjell på celleoverflaten.
- Chrysochromulina, med lang haptonema, sammentrekkbar, og med organiske skjell på celleoverflaten.

Det er et fykologisk ekspertisearbeid å foreta nærmere identifikasjon av aktuelle arter innenfor disse to slektene (Boney 1970).

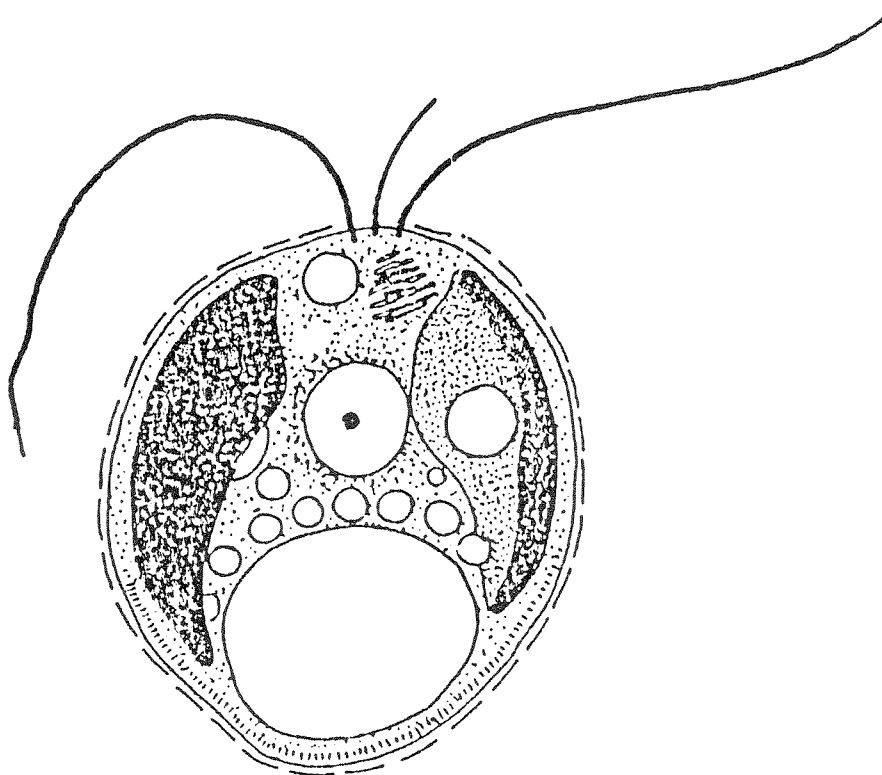
For å skaffe levende forsøksmateriale av Prymnesium ble det etablert kontakt med internasjonale kultursamlinger. Det var flere arter av Prymnesium tilgjengelig. Omlag femten stammer av Prymnesium foreligger i henhold til World Catalogue of Algae (1988), og av disse tilhører seks stammer arten P. parvum.

Forsøk på isolering av Prymnesium fra norske lokaliteter ble innledet. Dette resulterte i sikring av klonkulturer av Prymnesium cf. parvum. I NIVA's kultursamling er nå følgende kloner oppbevart:

- P. parvum Carter NIVA-3/88  
= strain 94, Plymouth Culture Collection, UK.
- P. parvum Carter NIVA-4/88  
= strain PRYM, Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton, USA.

- P. cf. parvum Carter NIVA-3/89  
 Isolert fra Yrkjesfjorden, Ryfylke, 14.8.1989.

Ved dyrking av Prymnesium anvendes medier basert på sjøvann med tilsetning av næringssalter, vitaminer og sporstoffer. Saliniteter på 24 ‰ og 33 ‰ blir brukt til våre kloner. Vi har benyttet temperaturen 20 °C og lys (kontinuerlig) 15-20  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



Prymnesium parvum.

Celldiameter ca. 10  $\mu\text{m}$ . Flagellene og haptonema er karakteristiske organeller. (Etter Boney 1970).

#### **PRODUKSJON OG EKSTRAKSJON AV TOKSIN**

Det toksiske prinsipp i Prymnesium parvum er sammensatt av minst seks adskilte kjemiske forbindelser (Shilo 1981). En heterogen gift av denne type består av kjemisk nær beslektede forbindelser med forskjellige virkninger (Yasumoto et al. 1990). Det toksiske prinsipp - prymnesin - er et eksotoksin, og skilles altså ut i mediet mens algen lever. Mengden prymnesin som dannes, er avhengig av genetiske forhold og vekstbetingelser. Erfaringen vår viser at produksjonen av



gift og algens vekst har til dels forskjellige optimalbetingelser.

Massedyrkingen av Prymnesium parvum har foregått under standardbetingelser (se ovenfor). Det er nødvendig å tilsette B-vitaminene tiamin og B<sub>12</sub> for å oppnå godt utbytte. Det oppnås gjerne konsentrasjoner av inntil  $200 \cdot 10^6$  celler/l under den praktiserte fremgangsmåte. Noen opplysninger om algens størrelsesforhold kan være av interesse:

Største cellediameter	~ 10 $\mu\text{m}$
Cellevolum	~ 524 $\mu\text{m}^3$
$1.91 \cdot 10^6$ celler	~ 1 $\text{mm}^3$
1 $\text{mm}^3$ celler	~ 1 mg levende materiale
1 mg levende alger	~ 0.1 mg frysetørket materiale.

Algene høstes ved centrifugering av kulturene. Det kan benyttes en kontinuerlig centrifugering med SS-1 Sorvall Super Speed (11 200 rpm x g, 200 ml/min). Temperaturmaksimum overskrider ikke 27 °C.

Separasjon og ekstraksjon av prymnesin (Ulitzur 1965) er utprøvet i samarbeid med Takeshi Yasumoto (Tohoku University, Japan). Anrikning og rensing er basert på toksinets ulike løselighetsforhold i organiske løsningsmidler. Ved bruk av kromatografiske kolonneteknikker kan et stoff med betydelig økning av spesifikk toksisk aktivitet bli fremskaffet. Et nøye samspill mellom bruk av biotester (se nedenfor) og kjemiske analyser er viktig for å kunne anrike toksinet hensiktsmessig.

## INNLEDENDE FORSØKSVIRKSOMHET

### 1. Etablering av metoder for å påvise hemolytisk effekt av algetoksin

Overvåking av algeoppblomstringer, og ha mulighet for å kunne konstatere om algen produserer gift, er vesentlig for å kunne forebygge og hindre skader og tap i fiskeoppdrettssammenheng. Etablering av undersøkelsesmetoder for å påvise toksindannelse vil effektivisere denne overvåkingen. Enkle in vitro metoder for å påvise algetoksin har også vist seg nyttig ved produksjon av algetoksin i kultur.

Prymnesin er kjent for å ha hemolytiske egenskaper (sprengning eller lysis av røde blodlegemer (erythrocytter)). En hemolytisk enhet er definert som den toksinmengde som hemolyserer 50 % av erythrocyttene i 1 ml storfeblod. Et mål for styrken på toksinet basert på denne egenskapen er "hemolytiske enheter" (HE). Et annet mål som har vært

benyttet er "ichthyotoksiske enheter" (IE). For å finne antall ichthyotoksiske enheter kreves toksisitetsforsøk med levende fisk og dermed et mer komplisert forsøksoppsett som vanskelig kan benyttes i rutinemessig overvåking.

Standardiserte hemolysetester utføres ved bruk av storfe (bovint) blod ved 37 °C. Ved testing av algetoksin i felt er dette en lite hensiktsmessig metode. Vi ønsket derfor å anvende fiskeblod ved temperaturer mer realistiske for det marine miljø. For også å kunne sammenligne våre tester med tidligere undersøkelser ble både bovint- og fiskeblod benyttet ved 18 og 35 °C.

Prymnesin ble brukt for å sammenligne hemolysegrad i storfe- og fiskeblod. Prinsippet for hemolysetesten er at en kjent mengde vaskede røde blodlegemer blandes med algetoksinet. Algetoksinet var fortynnet i en isoton saltløsning ("fiske-Ringer løsning") til gitte hemolytiske enheter. Etter en bestemt inkubasjonstid sentrifugeres toksin-erythrocyttløsningen og blodfargestoffet (hemoglobinet) i supernatanten bestemmes kolorimetrisk. Hemolysegraden angis i forhold til en på forhånd gitt standardkurve (Yariv and Hestrin 1961).

### Resultat og diskusjon

Tabell 1 viser resultatene fra hemolysetestene. Storfe- og fiske erythrocytter er blandet med en toksinløsning som etter anvisning på toksinampullen skulle tilsvare henholdsvis 200 og 25 hemolytiske enheter. Prøvene har vært inkubert i 45 og 90 minutter i 35 og 18 °C. Hemolysegraden etter inkubasjon ble målt til mellom 0,43 og 0,17 HE. Resultatet av disse undersøkelsene viste at det kommersielt tilgjengelige toksinet ikke inneholdt den hemolytiske aktiviteten som var angitt. Forsøkene ga heller ikke noen sikker indikasjon på om hemolysetesten kan brukes på lakseblod. Lakseblod synes imidlertid å tåle påkjenningen med sentrifugering og vasking av de røde blodlegemene med påfølgende inkubering i 35 °C i henholdsvis 45 og 90 minutter. Om metoden vil være en sikker metode for påvisning av toksin ved algeoppblomstringer, er fortsatt uklart. Fordelen med metoden er at den er rask og billig å utføre, samt at det ikke er nødvendig med oppsett av utstyr for toksikologiske forsøk med levende fisk. En svakhet ved metoden er at alger produserer forskjellige toksiske produkter, og det er ikke sikkert at fravær av hemolytisk toksin betyr fravær av andre toksiner. Et krav til et godt indikatorsystem er at det dekker spekteret av muligheter.

Tabell 1. Hemolytiske egenskaper av prymnesin tilsatt fiskeblod (F) og bovint blod (B) ved 18 og 35 °C i 45 og 90 minutter. Styrke av toksinet m.h.t. hemolytiske enheter (HE) og målt effekt er angitt samt hemoglobinmengde (HB, mg/l) i plasma og % hemolyse.

Eksponering				Målt		
HE	Inkubasjon minutter	Temp °C	Bloodtype B/F	HB mg/100 ml	% hemolyse	HE
200	45	35	F	0,3	13	0,26
			B	0,2	8,7	0,17
		18	F	0,3	13	0,26
			B	0,3	13	0,26
	90	35	F	0,5	21,7	0,43
			B	0,5	21,7	0,43
		18	F	0,3	13	0,26
			B	0,3	13	0,26
25	45	35	F	0,3	13	0,26
			B	0,2	8,7	0,17
		18	F	0,2	8,7	0,17
			B	0,2	8,7	0,17
	90	35	F	0,2	8,7	0,17
			B	0,2	8,7	0,17
		18	F	0,2	8,7	0,17
			B	0,2	8,7	0,17
Standard				2,3	100	

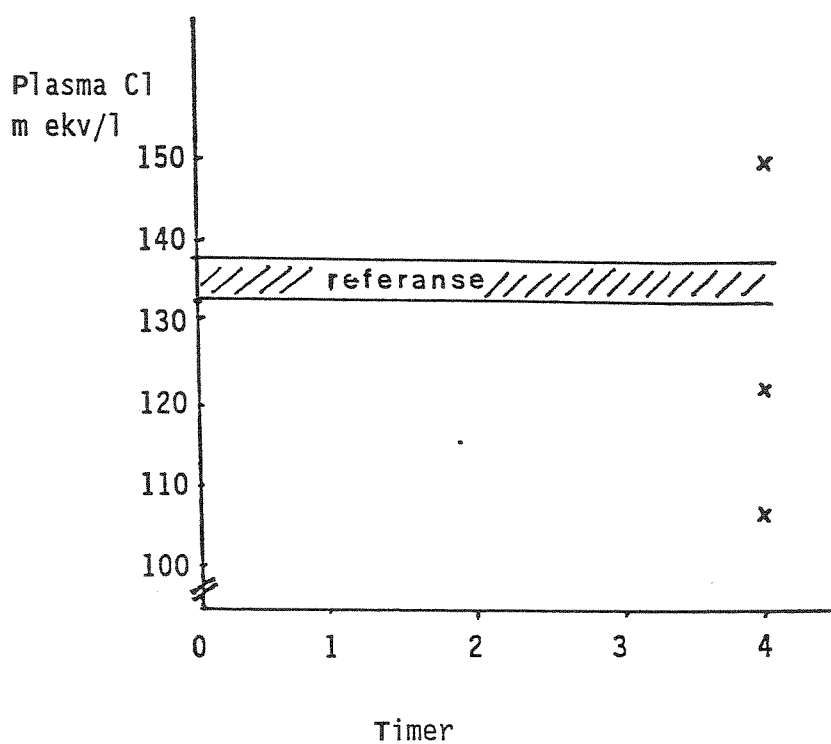
## 2. Eksperimentelle undersøkelser av giftvirkninger (toksisk effekt) på fisk

Prymnesin er angitt å ha flere toksiske egenskaper, hvor hemolyse er en av dem. Det er også påvist toksiske komponenter som virker på ionepermeabiliteten over cellemembraner, og en antar at algen kan produsere toksin som virker på sentralnervesystemet. For å finne ut om prymnesinet hadde tapt andre toksiske egenskaper enn hemolyse, ble det gjennomført en akutt toksisitetstest med laks i saltvann. En salinitet på 20 promille ble valgt idet de fleste lakseoppdrett med dødelighet sommeren 1989 hadde denne saliniteten (Serikstad pers.med.)

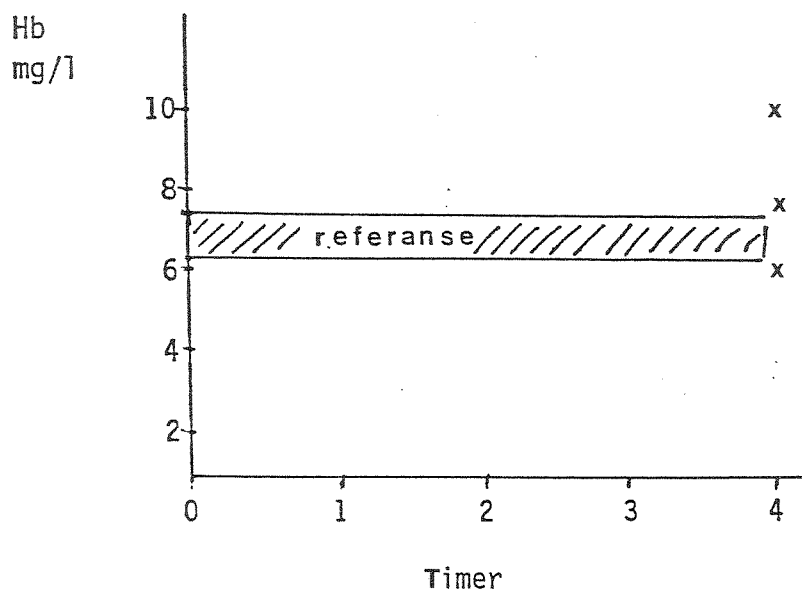
Forsøkene ble utført i to 20 liters akvarier uten vannutskiftning hvor det ene ble benyttet til kontrollfisk og et til de toksikologiske undersøkelsene. Vannet ble oksygenert. Vanntemperaturen var 12,6 °C, oksygeninnholdet ble målt til 7 - 8,6 mg O<sub>2</sub>/l. Fisken var sultet i 2 døgn før forsøkets start. På grunn av liten toksinmengde, måtte antall fisk begrenses til 3 stk pr. akvarium. Kontrollfisken ble prøvetatt ved start og slutt av forsøket. Vekt på forsøksfisken var mellom 130 - 310 g.

0,5 ml prymnesin (25000 HE) ble blandet ut i akvariene. Dette tilsvarer en konsentrasjon på 1.25 HE/ml i akvariet.

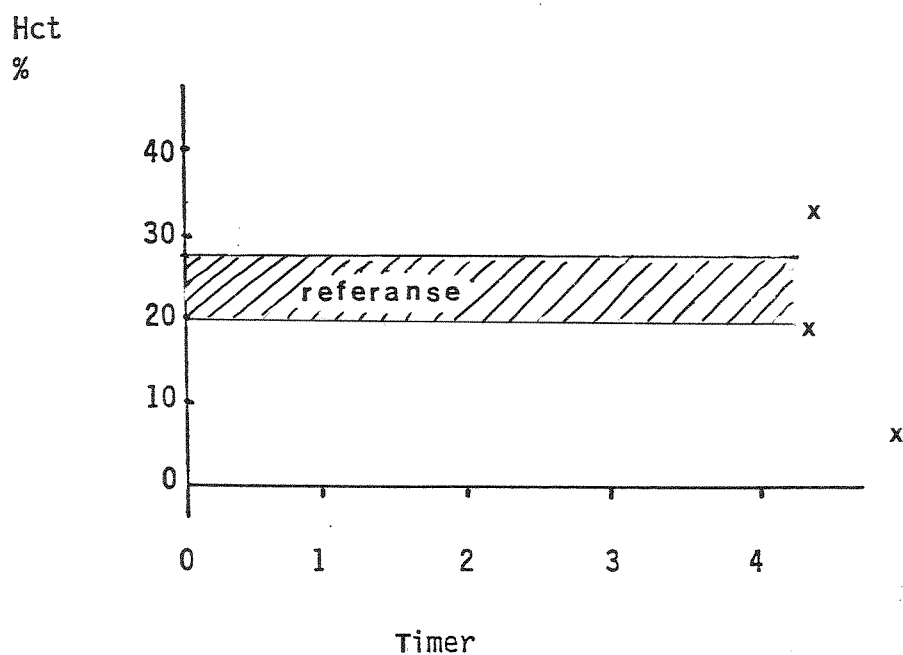
Fiskens oppførsel og respirasjonsfrekvens ble observert, og det ble tatt ut blodprøve hvor hematokritt, hemoglobin og plasmaklorid ble målt. Videre ble gjelleprøver tatt ut og fiksert på formalin til histologisk undersøkelse ved Veterinærinstituttet.



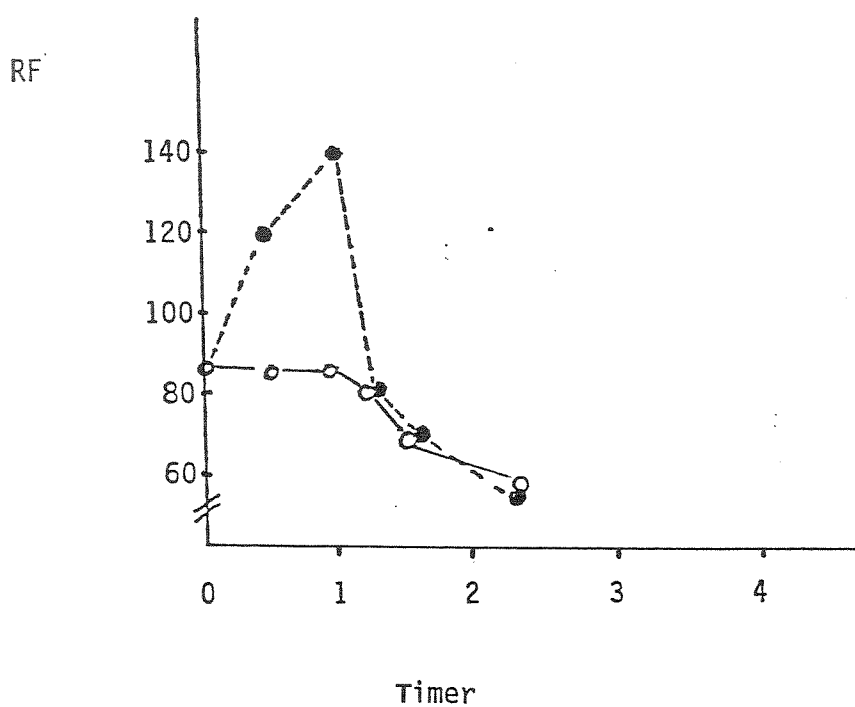
Figur 1 a. Plasmaklorid hos 3 laks eksponert for prymnesin, 1,25 HE/ml, i 4 timer. 3 fisk i kontrollgruppen er angitt som referanse.



Figur 1 b. Hemoglobin (Hb) i heparinblod hos 3 laks eksponert for prymnesin etter 4 timer. Hemoglobinverdiene hos 3 kontrollfisk er angitt som referanse.



Figur 1 c. Hematokritt (Hct) hos 3 laks eksponert for prymnesin etter 4 timer. Hematokritt hos 3 kontrollfisk er angitt som referanse.



Figur 1 d. Respirasjonsfrekvens målt som antall gjellelokslag/minutt, (RF) hos laks eksponert for prymnesin i 4 timer (●) sammenlignet med kontrollfisk (○).

## Resultat

Figurene 1 a - d viser resultater av blodundersøkelser av 3 laks som har vært eksponert til prymnesin i 240 minutter, samt 3 kontrollfisk som har gått under tilsvarende betingelser uten toksin.

Ved forsøksstart er hematokritt (Hct) målt til 20, hemoglobin (Hb) målt til 6,3 - 6,7 mg/l og plasmaklorid ( $\text{Cl}^-$ ) til 135 - 137 m ekv/l. Dette er verdier som ligger innenfor normalområdet for laks i saltvann. Etter 4 timer var verdiene hos kontrollfisken fortsatt stabile med Hct på 25 - 28, Hb på 6,9 - 7,5 og  $\text{Cl}^-$  på 134 - 138. Den toksineksponerte fisken viste større variasjon i verdiene og særlig med utslag i plasmaklorid: Hct 20 - 32, Hb 5,5 - 8,7 og  $\text{Cl}^-$  105 - 150 (figur 1 a-c).

Observasjon av oppførsel og respirasjonsfrekvens viste at fisk eksponert for toksin hadde forøket respirasjon i en periode på 1/2 til 1 time etter forsøket startet for deretter å normalisere seg etter 1 1/2 time (figur 1 d). Fisken som var eksponert for toksinet, oppførte seg også annerledes enn kontrollfisken ved å stå mer i ro og reagere mindre på ytre stimuli.

De histologiske undersøkelsene av gjellene som ble foretatt ved Veterinærinstituttet viste ikke forandringer som kunne tilskrives toksinvirkningen.

## Diskusjon og konklusjoner

På grunn av de små mengdene med toksin var antall fisk i forsøket alt for lite til å kunne trekke sikre konklusjoner.

Det er rapportert fra fiskedøden i forbindelse med naturlige algeoppblomstringer at relativt store gjelleskader kan observeres på død og døende fisk (Leivestad og Serikstad 1989). De mest typiske forandringene som sees, er omfattende løsning av gjelleepitel.

Forsøket vårt kan imidlertid tyde på at fisken har fått påvirket osmoreguleringen som særlig kommer til uttrykk i plasmakloridkonsentrasjonen. De målte verdiene hos forsøksfisken gir imidlertid både forhøyet og redusert verdi i forhold til kontrollen. Endringer i kloridionebalansen kan skyldes direkte toksiske skader på gjellene med forandret permeabilitet av gjellemembranen. Dette er beskrevet av Shilo (1981). Økt permeabilitet over gjellene eller annet vev vil imidlertid i saltvann føre til tap av vann og opptak av salter, deriblant klorid. Plasmaklorid vil således vise forhøyet verdi (Rosseland et al., 1982).

Økt plasmaklorid vil gi lave hematokrittverdier ved osmotisk krymping av de røde blodcellene, og omvendt, et for lavt plasmakloridnivå vil forårsake svelling av de røde blodlegemene og økt hematokritt.

Endringer i plasmaklorid kan også sees ved mer uspesifikk stressing uten direkte toksisk effekt på grunn av svikt i osmoreguleringen.

Dersom det tilsatte toksinet har hatt hemolytisk effekt, ville både hematokritt og hemoglobin ha sunket i verdi. Målingene som er foretatt, tyder ikke på at det er utviklet hemolyse.

Om spredningen i plasmaklorid indikerer påvirkning fra toksinet, kan derfor vanskelig konkluderes.

Den økte respirasjonsfrekvensen og de øvrige forandringene i oppførsel tyder imidlertid på at den toksineksponerte fisken ble utsatt for en ytre påkjenning eller stressituasjon i forhold til referansen. Etter 1 - 1 1/2 time hadde respirasjonsfrekvensen normalisert seg, men blodverdiene viste at fisken fortsatt hadde forandringer i ionebalansen etter 4 timer.

Respirasjonsforstyrrelsen kan være forårsaket av en forbindelse som direkte har irritert gjellevevet. En senere normalisering kan tyde på at denne forbindelsen enten er nedbrutt eller blitt bundet f.eks. til slim eller andre chelaterende forbindelser i vannet. Da vannet i akvariene ikke ble skiftet under forsøket, vil bl.a. fiskens stoffskifteprodukter opphopes og gi grunnlag for slike endringer. Dette er bl.a. vist i vann med høy konsentrasjon av uorganiske aluminiumforbindelser som ved gitt pH medfører økt respirasjonsfrekvens. Tilsetning av en chelator som binder Al uten at andre vannkjemiske parametre endres, normaliserer respirasjonsfrekvensen (Leivestad et al., 1987). I motsetning til respirasjonsfrekvensen vil en endring i plasmaioner bruke lenger tid for normalisering selv om den primære stressfaktor forsvinner.

Ut fra disse forsøkene med varierende og uspesifikke symptomer er det imidlertid vanskelig å angi den toksiske effekten av prymnesinet. Det kan heller ikke utelukkes at prymnesinet gjennom lang lagring (ca. 10 år) har blitt inaktivert helt eller delvis i ampullen.

### 3. Bruk av nye metoder for studier av virkningsmekanismer

Det har vist seg vanskelig å karakterisere det toksiske prinsipp i Chrysochromulina polylepis. Årsakene er flere, men særlig kompliserende er det forhold at flere nærbeslektede forbindelser (mer



enn tre) inngår. Samtidig er stoffene delvis ustabile. Giftens virkninger deles foreløpig i tre grupper (hemolytisk, antispasmodisk og ichthyotoksisk). Det toksiske prinsipp består altså av flere stoffer med forskjellige virkninger (heterogen gift).

Vi har i samarbeid med Biologisk institutt (Universitetet i Bergen) innledet forsøk med å studere den membranolytiske virkning av det toksiske prinsipp (Dall-Larsen et al. 1989). Forsøkene blir gjort med et testsystem bestående av et protonpumpende vesikkelpreparat isolert fra gjellepitelceller hos laks. Virkningen av toksinet fra oppdyrket algemateriale på vesikkelmembranen blir observert gjennom elektron spin resonansstudier (Klungsoyr 1987).

Resultatene har vist at metoden er egnet. Gift fra oppdyrket Chrysochromulina polylepis (klon NIVA-1/89) gir f.eks. lysis av vesiklene. Fjernes den hemolyserende fraksjon fra det toksiske prinsipp, forblir vesiklene inntakt i tilsvarende forsøk.

For å studere eventuelle nevrotoksiske effekter av de aktuelle algegifter, er det i et samarbeid med Statens institutt for folkehelse innledet forsøk med bruk av et in vitro testsystem (Andersen et al. 1987). Fremgangsmåten består i å anvende en cholinerg synapse (Nervus phrenicus - rottediafragma) til å identifisere toksisk virkning på selve nerven (presynaptisk), i synapsen (frigivelse og nedbryting av acetylcholin) eller på muskelen (postsynaptisk). Detaljerte studier av doser og virkningsmekanismer kan være mulig. Foreløpig er bare testsystemet utprøvet til formålet.

#### 4. Forsøk med kjemisk kontroll av Chrysochromulina polylepis

I forbindelse med opplysninger i litteraturen (Shilo 1981) om giftvirkning av ammonium i små konsentrasjoner på Prymnesium parvum, og bruk av ammonium til bekjempelse av giftige oppblomstringer av denne algen i fiskeoppdrettsanlegg i Israel, har vi satt i gang innledende forsøk for å etterprøve dette på kulturer av Prymnesium og Chrysochromulina.

Ammonium er et stoff som algene gjerne foretrekker som nitrogenkilde til sin vekst. Men ved høye pH-verdier kan imidlertid ammonium virke toksisk på fotosyntetiserende organismer. Dette forhold er knyttet til øket diffusjon av ikkeprotonerte  $\text{NH}_3$  inn i algecellene, forårsaket av pH-gradienten fra ytre til indre miljø over cellemembranen.

Forsøkene vi har utført tyder på at pH i kulturene har slik avgjørende betydning for giftvirkningen av ammonium på Chrysochromulina (klon NIVA-1/89).

Flere forsøk må gjøres for å klarlegge forholdet nærmere. De foreliggende resultater er lovende.

## FELTVIRKSOMHET

I august 1989 ble det registrert oppblomstringer med giftige alger i fjorder i Rogaland. Det ble gjort observasjoner i utvalgte områder. (Yrkjesfjorden, Sandsfjorden og Hylsfjorden). NIVA hadde en forsker som deltok på tokt organisert av Havforskningsinstituttet.

Det var sammensatte populasjoner av flagellater som dannet oppblomstringene i 1989. Arter av bl.a. slektene Prymnesium og Chrysochromulina var dominerende. Konsentrasjonene av flagellater varierte mye i vannmassene. Ved prøvetaking 16.-17. august i Sandsfjorden ved 13 ‰ S var det f.eks.  $0.3 \cdot 10^6$  celler/l av Prymnesium sp. og  $6 \cdot 10^6$  celler/l av Chrysochromulina sp. Det er viktig å merke seg at det ikke var Chrysochromulina polylepis, men én eller flere andre arter som utviklet seg ved de aktuelle oppblomstringer. Prymnesium var representert med arten P. parvum.

Materiale av vannprøver, planktonalger og muslinger (Mytilus edulis) ble innsamlet under forgiftningsepisoden. På tilsvarende måte som etter feltarbeid under Chrysochromulina-oppblomstringen i 1988, blir det biologiske materialet lagret dypfrosset ( $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for bruk i prosjektet til nærmere undersøkelse.

## INFORMASJON

Prosjektgruppen har i 1989 deltatt i flere arbeidsmøter og på konferanser. Resultatene fra forskningsvirksomheten har blitt lagt frem i slik sammenheng (se litteraturliste til rapporten).

## VIDEREFØRING AV FORSKNINGSVIRKSOMHET

Prosjektet går ut på å fremskaffe grunnleggende kunnskaper om økotoksikologiske virkninger av de aktuelle algetoksiner og nyttiggjøring av innvunnet kompetanse på anvendte problemstillinger. I videreføringen av arbeidet vil noen utvalgte oppgaver stå sentralt. Dette gjelder:

#### - Utvikling av aktuelle biotestmetoder som et verktøy for overvåking

Resultatene fra den innledende forsøksvirksomhet med metoder for å påvise hemolytisk effekt av algetoksiner er lovende til formålet. Det er nødvendig å tilrettelegge fremgangsmåten for en praktisk bruk og utarbeide en bruksanvisning som veiledning til interesserte. Laboratorieundersøkelser er nødvendig for å avklare hemolysetestens begrensninger med hensyn til hvilke algegifter (produsert av ulike algetyper) som kan registreres og hvilke følsomhetsområder det dreier seg om.

Erfaringene fra eksperimentene med utprøving av et in vitro testsystem for påvisning av nevrotoksiner i akvatisk miljø kan legges til grunn for utvikling av et praktisk opplegg. Det er mulig å tilrettelegge et testsystem som både kan brukes i sammenheng med saltvannsalger og ferskvannsalger. Dette vil være et viktig hjelpemiddel til rask avklaring om algetoksiner med nerveeffekter foreligger i et tilfelle med oppblomstring av giftige alger.

#### - Forsøk knyttet til toksiske effekter av fytotflagellater

Denne forsøksvirksomhet er tenkt som en direkte videreføring av arbeidet hittil. Det innebærer oppdyrking av giftproduserende alger og anvendelse av separert toksin til virkningsstudier med akvatiske organismer. Fisk (laks, torsk) og plankton (krepssdyr, flagellater, diatoméer) vil være de viktigste forsøksobjektene. Foruten eksperimenter med intakte organismer, vil arbeidet også omfatte forsøk med bruk av organer og cellekulturer. Hensikten er å klarlegge de forskjellige virkninger (dose - respons) som toksinene har i det marine miljø. Denne kunnskap er avgjørende for vurdering av forgiftningsfare i aktuelle situasjoner.

#### - Kjemisk kontroll av algeoppblomstringer

Det er en rask utvikling på området kjemiske metoder for å kunne hindre skadelige oppblomstringer av alger. Det er viktig å bygge opp en norsk kompetanse om mulighetene som foreligger. For å kunne realisere dette, er det planlagt gjennomført fortsatte laboratorieeksperimenter med aktuelle flagellater (Prymnesium, Chrysochromulina) til formålet. Et utvalg viktige stoffer med vekstkontrollerende egenskaper vil bli benyttet til forsøkene.

### - Toksinenes anrikning i næringskjeden

Det er foreløpig svært mangelfull kunnskap om hvordan toksinene produsert av Prymnesium og Chrysochromulina kan anrikes i forskjellige ledd i næringskjeden. Slik kunnskap er vesentlig for bl.a. å kunne bedømme faremomenter knyttet til forgifting av ville populasjoner, dyrket fisk og mennesker. Observasjoner fra oppblomstringssituasjoner og fra eksperimentelle systemer (Solbergstrand) vil inngå i denne oppgaven.

Den kjemiske karakterisering av toksinene er en nødvendig forutsetning for en fullverdig behandling av problemstillingen. Det vil derfor bli satset på studium av utvalgte algetoksiner hvor det kjemiske grunnlaget foreligger.

For norsk produksjon av matfisk er det avgjørende å kunne ha faglige holdepunkter om denne problemstilling (kfr. matforgiftningen ciguatera).

Avslutningsvis vil vi fremheve at resultatene fra det innledende arbeidet, innøvelsen av metoder og de etablerte faglige kontakter lover godt for fortsatt fruktbar forskningsvirksomhet.

## HENVISNINGER

- Andersen, R.A., Malthe-Sørensen, D., Odden, E. og Fonnum, F. (1987). Effects of organophosphates on presynaptic events in the vascularly perfused phrenic nerve-hemidiaphragm preparation from the rat. *Biochemical Pharmacology* **36** (7): 1107-1117.
- Boney, A.D. (1970). Scale-bearing phytoflagellates, an interim review. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **8**: 251-305.
- Dall-Larsen, T., Klungsøyr, L., Justesen, N.P., og Skulberg, O.M. (1989). Prymnesiums virkning på fisk, en litteraturgjennomgang og nye resultater. Havforskerforeningen. Manuskript, 8 pp.
- Klungsøyr, L. (1987). Magnesium ion activated ATP-ase and proton transport in vesicles from the gill of rainbow trout (Salmo gairdnerii). *Comp. Biochem. Physiol.* **88 B** (4): 1125-1134.
- Leivestad, H., Jensen, E., Kjartansson, H. og Xingfu, L. (1987). Aqueous speciation of aluminium and toxic effects on Atlantic salmon. *Annls. Soc. r. zool. Belg.* **117** - supplement 1: 387-389.
- Leivestad, H. og Serikstad, B. (1989). Some observations on the effects of Chrysochromulina polylepis on the osmoregulation in fish. ICES-Workshop on the 1988 Chrysochromulina polylepis bloom, Bergen, February 28. to March 2., 1989.
- Rosseland, B.O., Lea, T. og Hansen, L.P. (1982). Physiological effects and survival of Carlingtagged and descaled Atlantic salmon, Salmo salar L., in different watersalinities. ICES, C.M. 1982/M: 30, 23 p.
- Shilo, M. (1981). The toxic principles of Prymnesium parvum. In: The Water Environment. W. W. Carmichael (ed.), Plenum Press, New York pp. 37-47.
- Starmach, K. (1985). Chrysophyceae und Haptophyceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 1. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 515 pp.
- Ulitzur, S. (1965). The mode of action of cofactors on the ichthiotoxic activity of Prymnesium toxin and other fish toxins. Ph.D. Thesis. Hebrew University, Jerusalem.

- Underdal, B., Skulberg, O. M., Dahl, E. and Aune, T. (1989). Disastrous bloom of Chrysochromulina polylepis (Prymnesiophyceae) in Norwegian coastal waters 1988. Mortality in Marine Biota. *Ambio* 18 (5): 265-270.
- World Catalogue of Algae (1988). World Data Center of Microorganisms, Japan.
- Yariv, J. og Hestrin, S. (1961). Toxicity of the extracellular phase of Prymnesium parvum cultures. *J. Gen. Microbiology*. 24. 165-175.
- Yasumoto, T., Underdal, B., Aune, T., Hormazabal, V., Skulberg, O.M. and Oshima, Y. (1990). Screening for hemolytic and ichthyotoxic components in Chrysochromulina polylepis and Gyrodinium aureolum from Norwegian coastal waters. In: Toxic Marine Phytoplankton. E. Graneli, B. Sundstrøm, L. Edler, D.M. Anderson (eds.) Elsevier, New York, pp. 436-440.

Norsk institutt for vannforskning  NIVA

Postboks 69, Korsvoll  
0808 Oslo 8

ISBN 82-577 -1735-5