

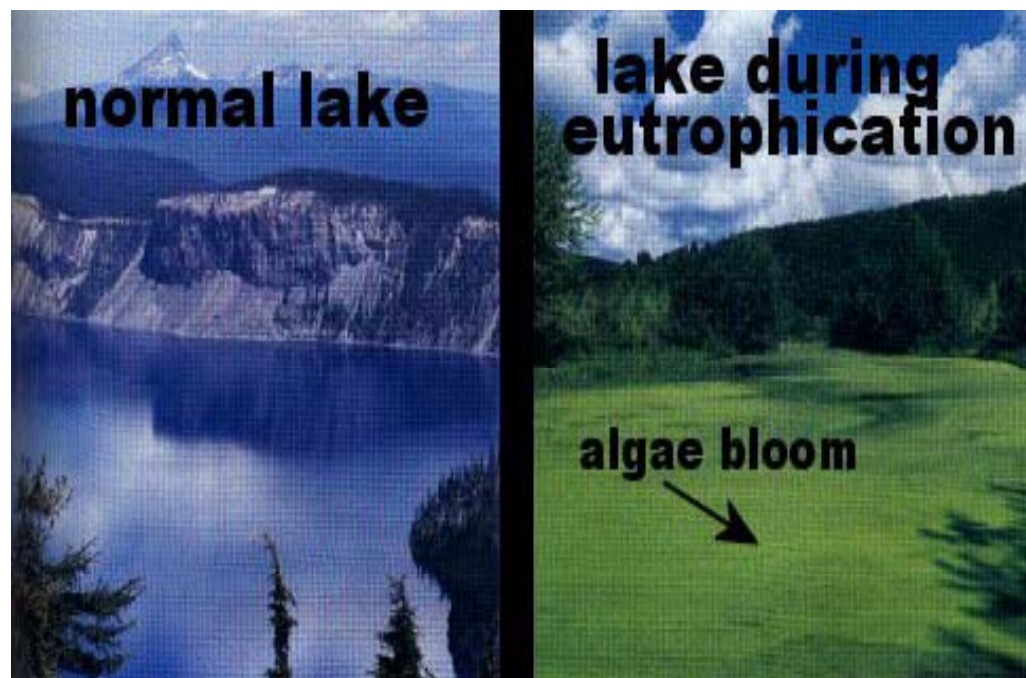
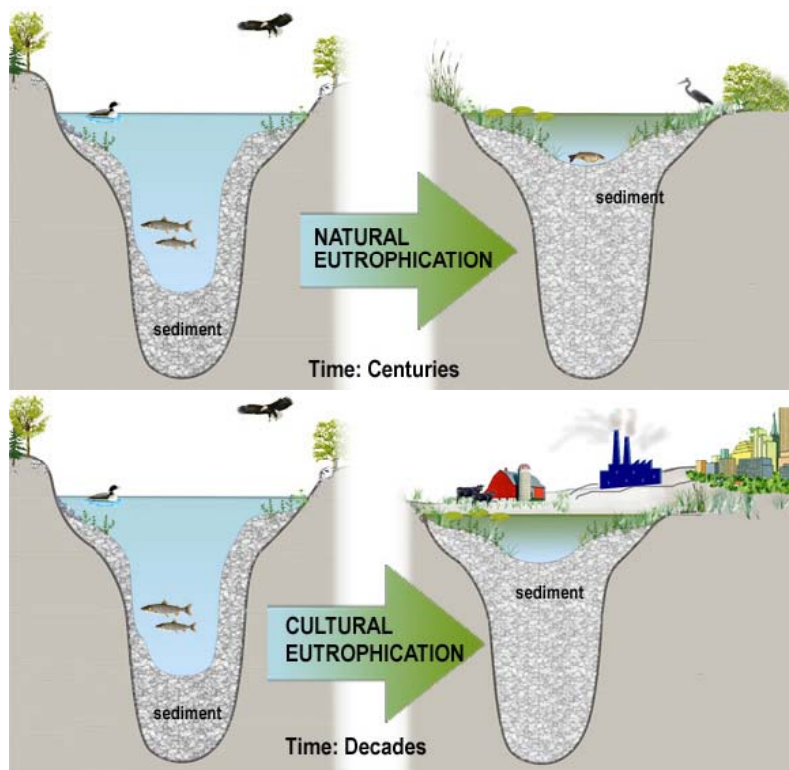


Problem cvetanja cijanobakterija i pojave cijanotoksina u vodi namenjenoj za vodosnabdevanje

Mr Jelica Simeunović, Dr Zorica Svirčev
Departman za Biologiju i ekologiju, PMF,
Trg D. Obradovića 2, 21000 Novi Sad

PROCES EUTROFIZACIJE

- Eutrofizacija kao biološki odgovor na suvišan priliv nutrijenata u vodeni ekosistem predstavlja proces povećanja biološke produkcije u vodi, koji se manifestuje povećanjem nivoa nutrijenata, obično fosfata i azotnih jedinjenja, što na kraju dovodi do pogoršavanja kvaliteta vode i smanjenja diverziteta vrsta na svim trofičkim nivoima.



- Ovakav proces se često može uočiti vidljivim prenamnožavanjem cijanobakterija i algi, pojavom površinskog penušanja, mutnoćom vode, pojavom plivajućih biljnih delova i agregacijama bentosnih makrofita.

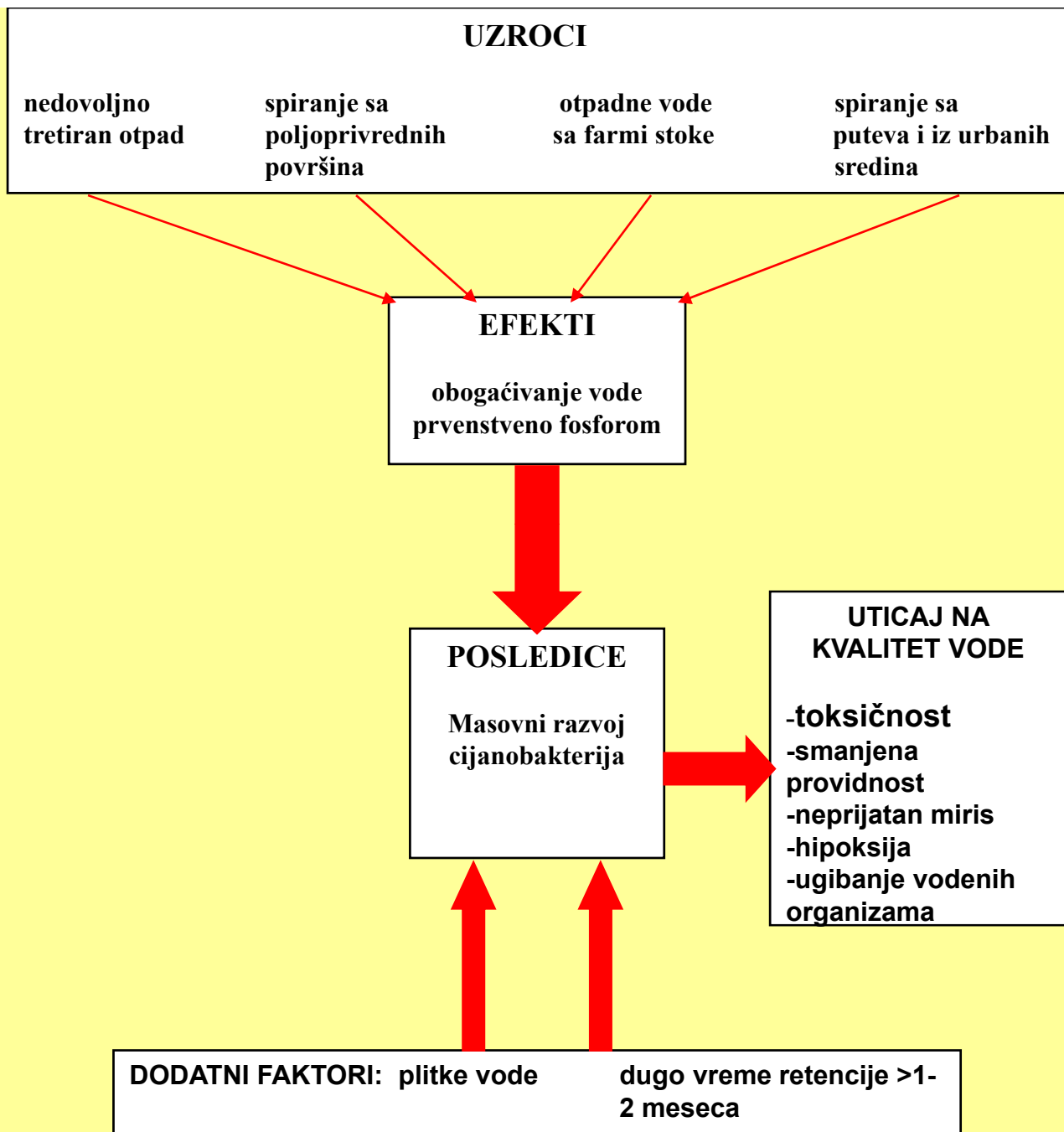
CVETANJE VODE

- U posebnim uslovima, naročito kada su vode bogate nutrijentima izložene svetlosti, cijanobakterije i alge mogu pokazati značajno ubrzan stepen reprodukcije, što rezultira naglim povećanjem ukupne biomase poznate pod nazivom **cvetanje**.
- Pojava izraženog prenamnožavanja se definiše kao **opasno algalno cvetanje** ("harmful algal blooms"-HABs) ukoliko je povezano sa negativnim posledicama po okolinu, kao što su mortalitet živog sveta, smanjenje submerzne akvatične vegetacije, poremećaj stabilnosti ekosistema, negativan uticaj na lance ishrane, produkcija veoma aktivnih toksičnih supstanci i dr.



Jezero Ludoš





Šema 1 Uzroci pojave masovnog razvoja cijanobakterija i uticaj na kvalitet vode

Cvetanje se najčešće manifestuje:

- Pojavom površinskih agregacija (nakupina) cijanobakterijske biomase;
- Promenom boje;
- Smanjenjem providnosti vode;
- Pojavom neprijatnog mirisa vode (geosmin (GSM) i 2-metilisoborneol (MIB));
- Hipoksijom;
- Produkcijom toksičnih supstanci;
- Ugibanjem vodenih organizama.

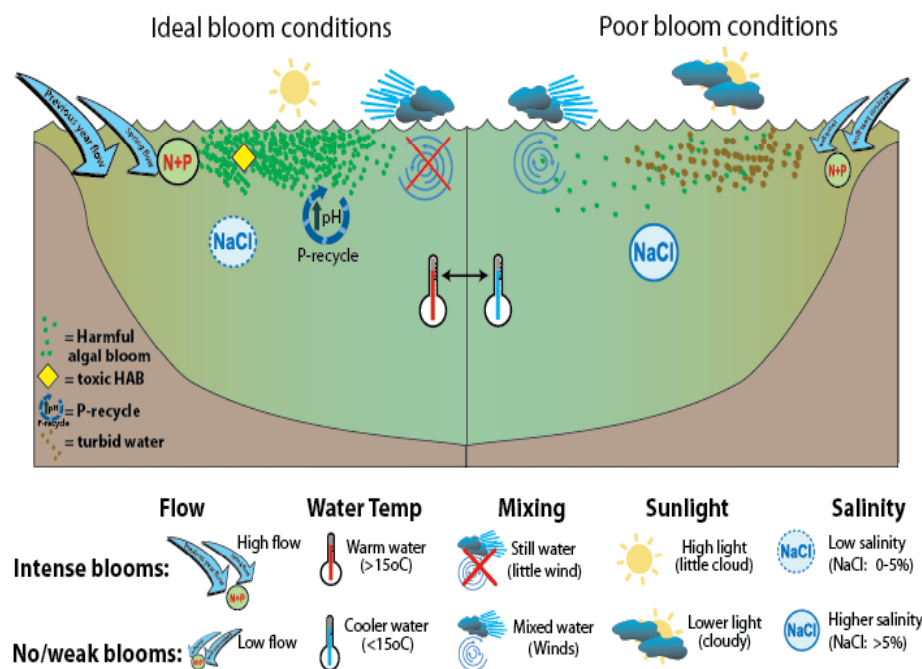


Cvetanja se prema Cloern (1996) mogu klasifikovati:

1. Periodičan sezonski događaj - traje nedeljama
2. Neperiodičan događaj koji traje kraći vremenski period - traje danima
3. Izniman događaj koji izaziva nekoliko dominantnih vrsta - traje mesecima

Uslovi koji najčešće dovode do pojave cvetanja cijanobakterija su:

- slaba pokretnost vode, stabilna vodena kolona,
- temperatura vode od 15 do 30 °C,
- neutralno do alkalna sredina (pH od 6 do 9 i više),
- povećana koncentracija azota i fosfora,
- niska koncentracija CO₂.



- **Cijanobakterije** (*Cyanobacteria*, *Cyanophyta*) predstavljaju vrlo raznovrsnu grupu prokariotskih fotosintetskih mikroorganizama koji se odlikuju specifičnim ekološkim, fiziološkim i biohemijskim karakteristikama, što im daje mogućnost da prirodnim putem produkuju širok spektar sekundarnih metabolita malih molekulskih težina -biološki aktivne materija (BAM).
- **Netoksične**
- **Potencijalno toksične**
- **Toksične**



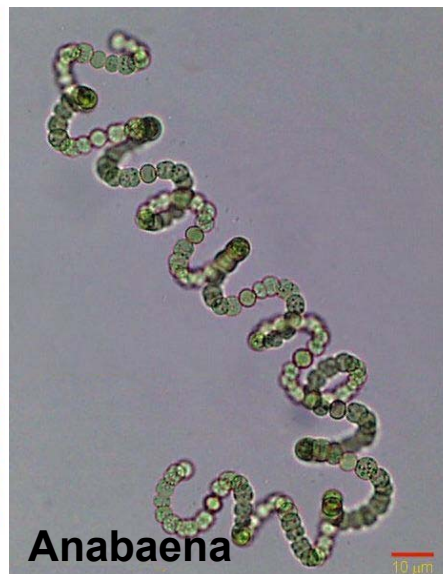
(a) Filamentous, with heterocysts



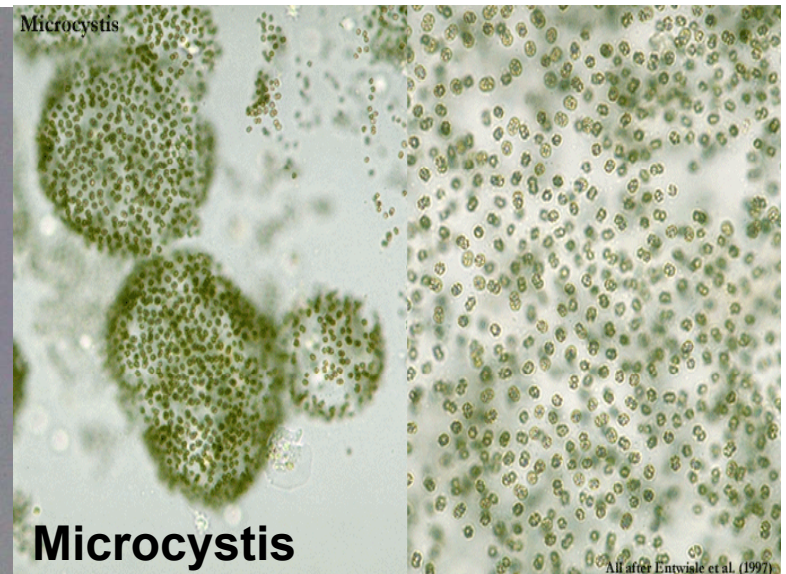
(b) Nonfilamentous



(c) Branching, filamentous



Anabaena



Microcystis

CIJANOTOKSINI

- Toksične biološki aktivne materije različite hemijske strukture i delovanja koje predstavljaju produkte sekundarnog metabolizma kod cijanobakterija nazivaju se **cijanotoksini**.
- Po hemijskom sastavu to su najšestće
- peptidi,
- alkaloidi i
- alkilfenoli.
- Smatra se da oko 50% cijanobakterija izazivača cvetanja ima sposobnost produkcije toksina.

- **Trovanje cijanotoksinima može da bude posledica:**
 - direktnog kontakta sa njima,
 - ingestijom vode za piće u kojoj su prisutni toksini,
 - konzumiranja vodenih kičmenjaka i beskičmenjaka u čijim tkivima je došlo do akumuliranja toksina -preko lanaca ishrane toksini dospevaju u organizam sisara,
 - inhalacije aerosola i vodene pare.
- **Problemi** koji mogu nastati kod ljudi u kontaktu sa toksinima su razne vrste dermatitisa, tumori, gastrointestinalni poremećaji, hepatoenteritisi, atipične pneumonije i neurološki problemi.

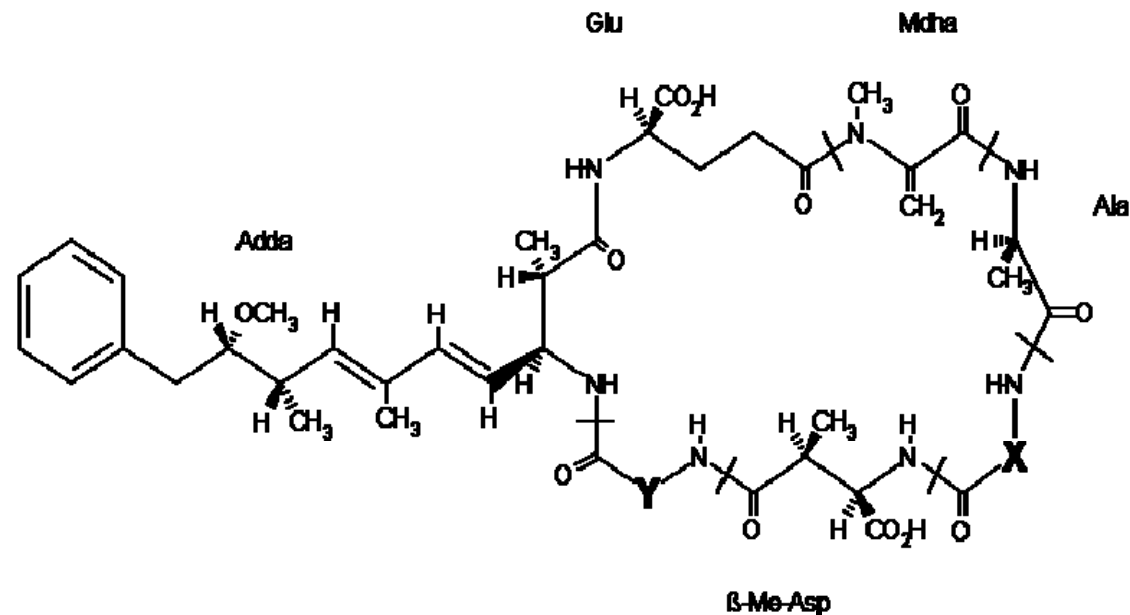


Cijanotoksini su prema načinu delovanja odnosno prema tipu toksičnosti koji izazivaju kod životinja i ljudi, u njihovim organima ili ćelijama, podeljeni u 4 klase:

- 1. HEPATOTOKSINI - mikrocistini, nodularini i cilindrospermopsin***
- 2. NEUROTOKSINI - anatoksini i saksitoksini***
- 3. DERMATOTOKSINI - aplaziatoksini i lingbiatoksin***
- 4. LIPOPOLISAHARIDNI ENDOTOKSINI (LPS) - iritirajući toksini***

HEPATOTOKSINI

- Najčešće prisutni u toku cvetanju površinskih voda su ciklični peptidni hepatotoksini
- Ovi toksini izazivaju hemoragiju i druge poremećaje jetre i stimulišu rast ćelija tumora.
- Najzastupljeniji u površinskim vodama su mikrocistini (poznato 80-tak strukturnih varijeteta mikrocistina i njihovih analoga, pri čemu je konstatovano da je mikrocistin – LR najčešće prisutan toksin)

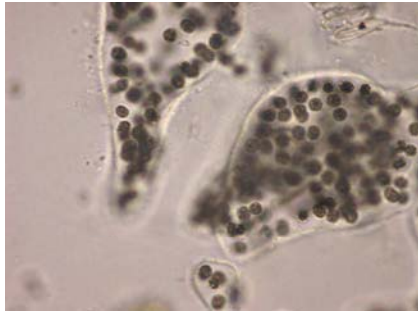


	X	Y
MC-RR	Arginin	Arginin
MC-YR	Tryptophan	Arginin
MC-LR	Leucin	Arginin
MC-LA	Leucin	Alanin

- Toksičnost mikrocistina ogleda se kroz inhibiciju serin/treonin protein fosfataza 1 i 2A, enzima koji su posebno važni u regulaciji genetičkih, metaboličkih i fizioloških procesa kod svih živih organizama.
- Toksikacija dovodi do poremećaja strukture i funkcije jetre, nekroze hepatocita i na kraju do hemoragije. Osim oštećenje jetre u slučaju akutnog trovanja mogu se javiti i hipoksemija, kolaps srca i šok.
- Izlaganje ćelije sisara niskim koncentracijama mikrocistina takođe predstavlja opasnost jer dovodi do hroničnog efekta izazivajući pojavu tumora, zbog čega su ovi toksini označeni kao promoteri karcinoma-
problem je naročito izražen kada su vode za piće u pitanju.

- Epidemiološka istraživanja su pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije mikrocistina u izvorima za vodosnabdevanje i broja slučajeva kancera jetre kod ljudi u Kini (McElhiney i Lawton, 2005) i Srbije (Svirčev i sar., 2009).
- Svetska zdravstvena organizacija (WHO, 1998) ustanovila je preporučenu dozvoljenu koncentraciju za toksin mikrocistin- LR u pijaćoj vodi koja iznosi $1 \mu\text{g/l}$.
-
- Na osnovu vrednosti datih za mikrocistin-LR, ukoliko odrasla osoba težine 60 kg konzumira 100 ml vode koja sadrži $20 \mu\text{g/L}$ MCYST-LR , ovaj nivo toksina rezultira u potrošnji koja je bliska tolerišućem dnevnom unosu (TDI) od $0.04 \mu\text{g/kg-d}$ telesne težine.

Producenti mikrocistina su mnoge vrste rodova:



Microcystis



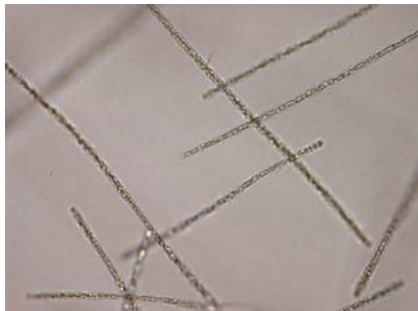
Anabaena



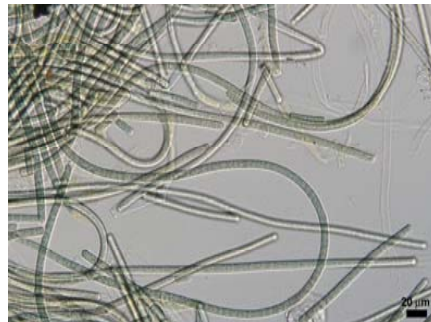
Nostoc



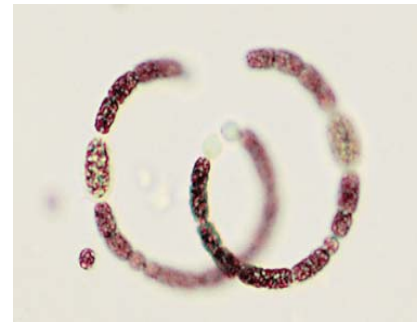
Oscillatoria



Planktothrix



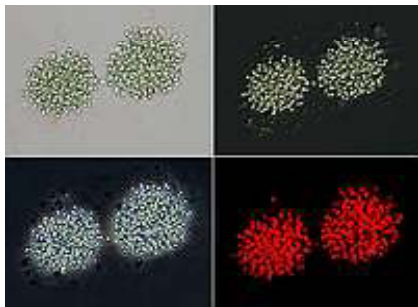
Phormidium



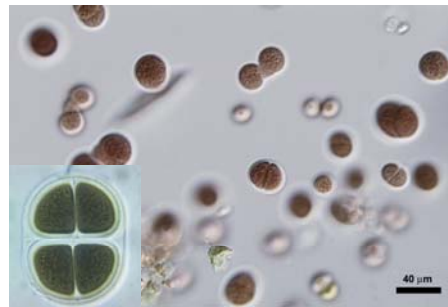
Anabaenopsis



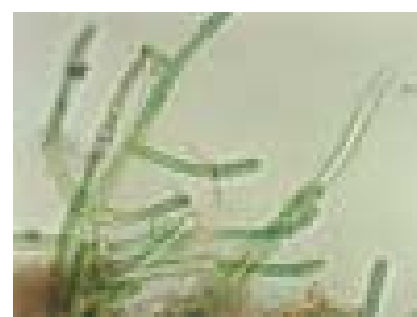
Synechococcus



Radiocystis



Chroococcus

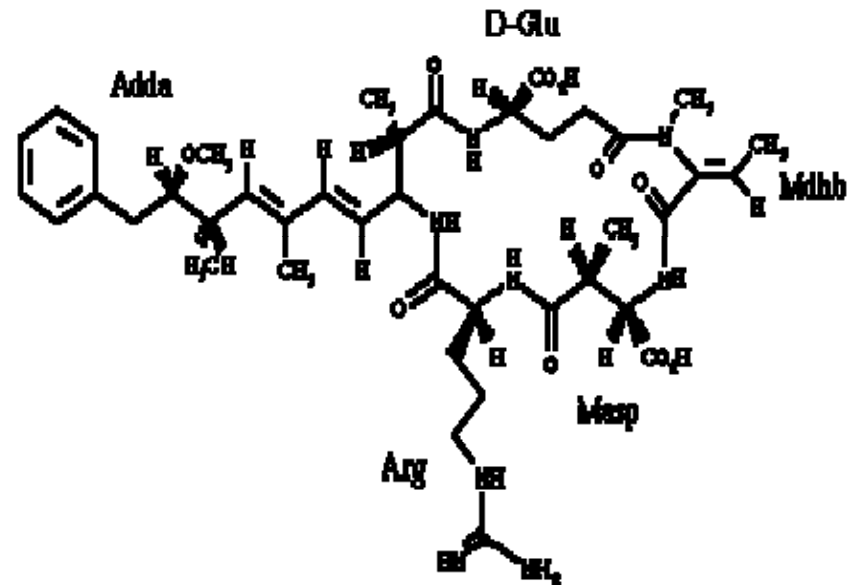
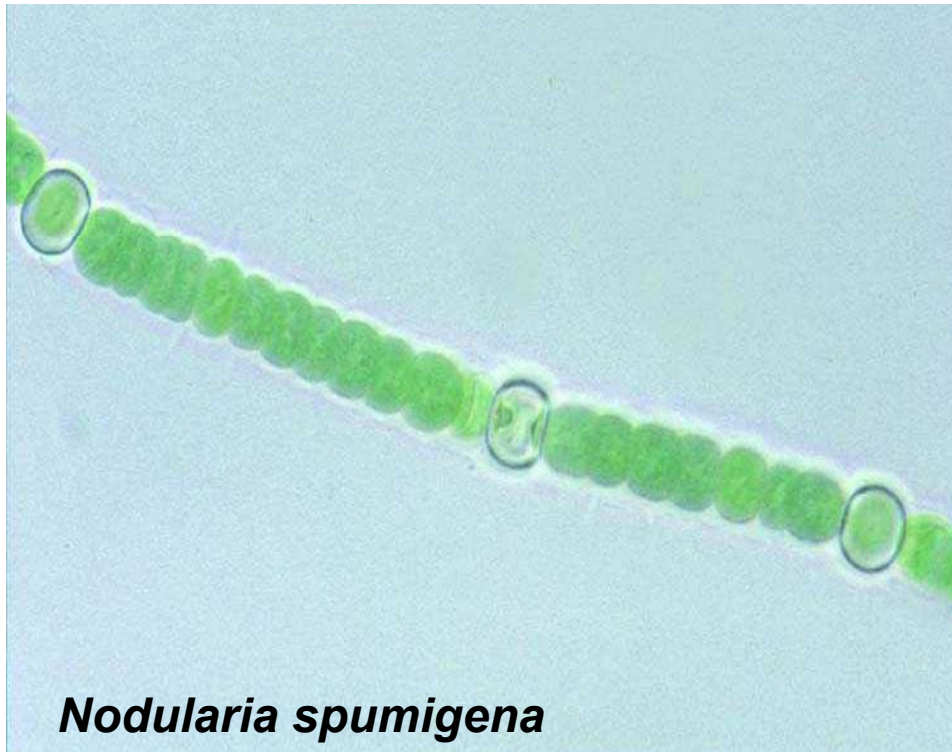


Hapalosiphon



Lyngbya

- Cijanobakterijska vrsta *Nodularia spumigena* je glavni producent hepatotoksina nodularina, cikličnog pentapeptida izuzetno visoke toksičnosti.



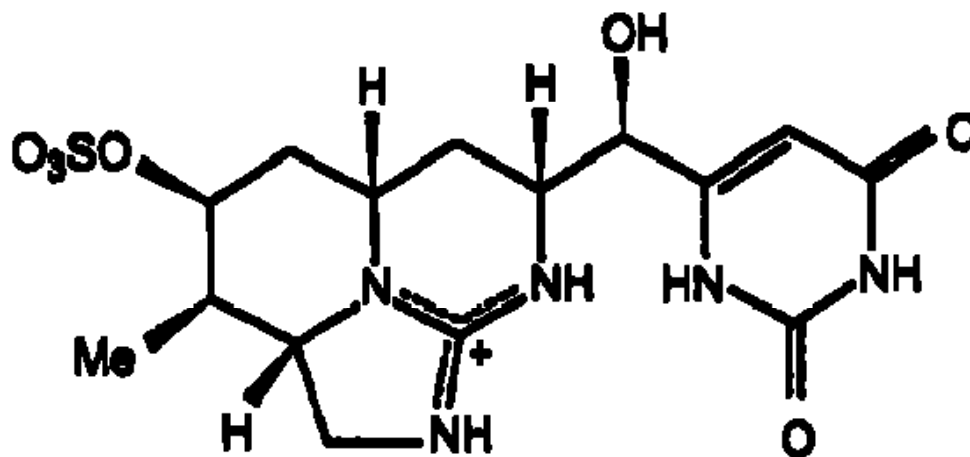
Hepatotoksin nodularin

Trovanje hepatotoksinima prepoznaje se po znacima kao što su: opšta slabost, bledilo, teško disanje, šok, abdominalni bolovi, nadutost, povraćanje, dijareja, ubrzan ili slab puls.

- **Cilindrospermopsin**, ciklični alkaloid guanidina izolovan je iz cijanobakterijske vrste *Cylindrospermopsis raciborskii* .
- Toksičnost se ispoljava preko inhibicije sinteze proteina i izazivanja oštećenja bubrega, slezine, creva, srca, timusa.
- Toksin izaziva proces nekroze hepatocita što dovodi do ozbiljnih oštećenja jetre. Toksin ispoljava negativan efekat i na druge ćelije različitih tkiva zbog čega se često svrstava u citotoksične cijanotoksine .



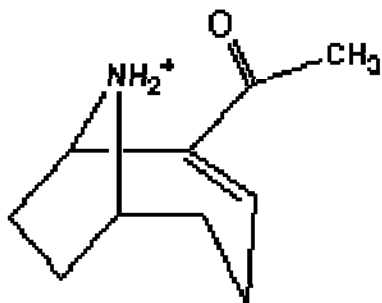
Cylindrospermopsis raciborskii



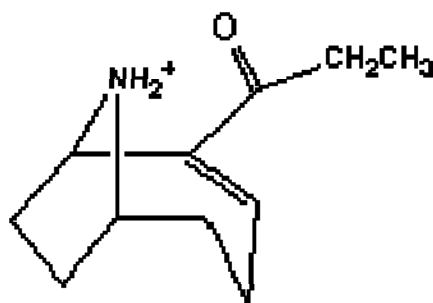
Cilindrospermopsin

NEUROTOKSINI

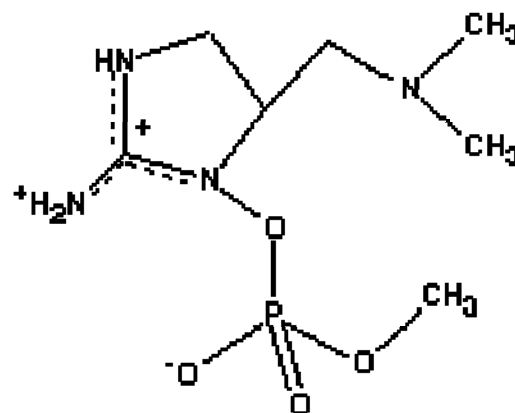
- Veliki broj rodova cijanobakterija karakteriše produkuje neurotoksina od kojih su najčešći **anatoksini** (anatoksin-a, homoanatoksin-a i anatoksin-a (S)) i **saksitoksini**.
- Neurotoksini se još nazivaju i brzo delujući toksini jer se letalni efekat može ispoljiti već za nekoliko minuta odnosno sati nakon unošenja u organizam.
- Anatoksin-a i homoanatoksin-a kao moćni postsinaptički depolarizirajući agensi deluju na neuromuskulatornu vezu, dovode do toga da su mišićne ćelije stalno stimulisane izazivajući vrtoglavicu, teturanje, otežano disanje, paralizu grudnih mišića, konvulziju i smrt.
- Anatoksin-a(S) ireverzibilno inhibiše enzim acetilholin esterazu.
- Kod životinja izazivaju hipersalivaciju, tremor, neartikulisanošć mišića, dijareju, cijanozis (modar jezik i usta) i smrt.



anatoxin-a

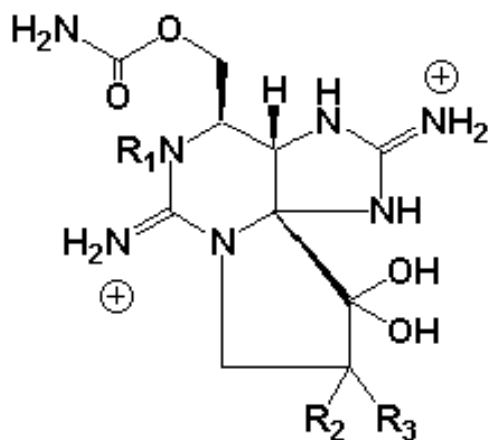


homoanatoxin-a



anatoxin-a(S)

- Saksitoksini predstavljaju grupu karbamidnih alkaloida koji selektivno blokiraju voltažno-zavisne natrijumove kanale zaustavljajući propagaciju nervnih impulsa izazivajući paralizu mišićnih ćelija koje ostaju na taj način bez stimulacije.
- Saksitoksini su poznati i kao paralizirajući toksini ljuskara (Paralytic Shellfish Poisoning Toxins - PST).
- Nervno tkivo je naročito osetljivo prema toj grupi toksina i u ranim stadijumima trovanja, žrtve osećaju peckanje i ukočenost usta, jezika, lica i ekstremiteta, otežano gutanje i otežan govor.



STX	R ₁	R ₂	R ₃
STX	H	H	H
GTX-II	H	H	OSO ₃ ⁻
GTX-III	H	OSO ₃ ⁻	H
NeoSTX	OH	H	H
GTX-I	OH	H	OSO ₃ ⁻
GTX-IV	OH	OSO ₃ ⁻	H

Saksitoksini



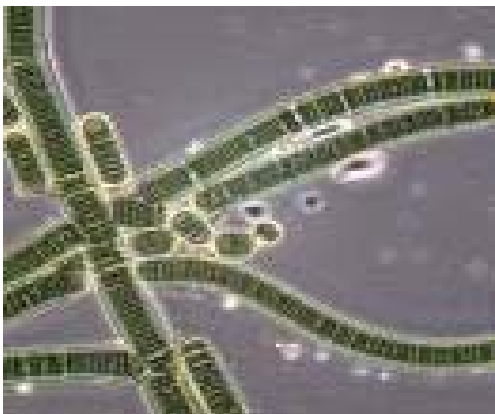
Rod *Anabaena*



Rod *Aphanizomenon*

DERMATOTOKSINI

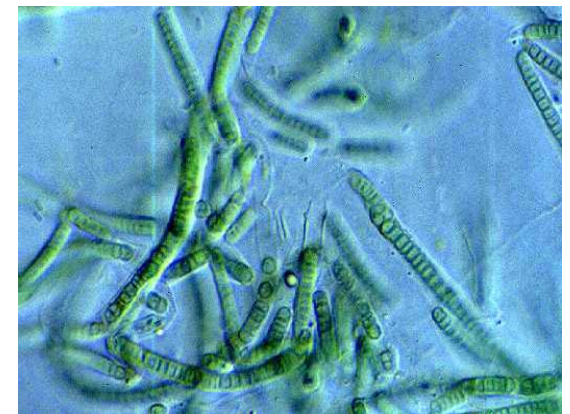
- Različite vrste cijanobakterijskih rodova kao što su *Lyngbya*, *Oscillatoria* i *Schizothrix* mogu biti značajni producenti dermatotoksina, koji izazivaju različite iritacije, alergijske i druge promene na koži i unutrašnjim organima.
- Pojedine vrste roda *Lyngbya* su naročito poznate po produkciji aplaziotoksina i debromoaplaziotoksina, jedinjenja koja su pokretači tumora i aktivatori enzima proteinkinaza.



Rod *Lyngbya*



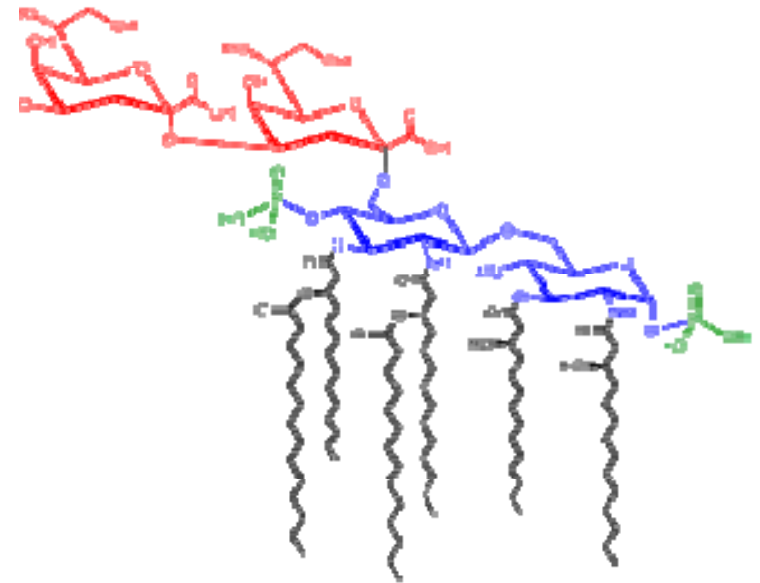
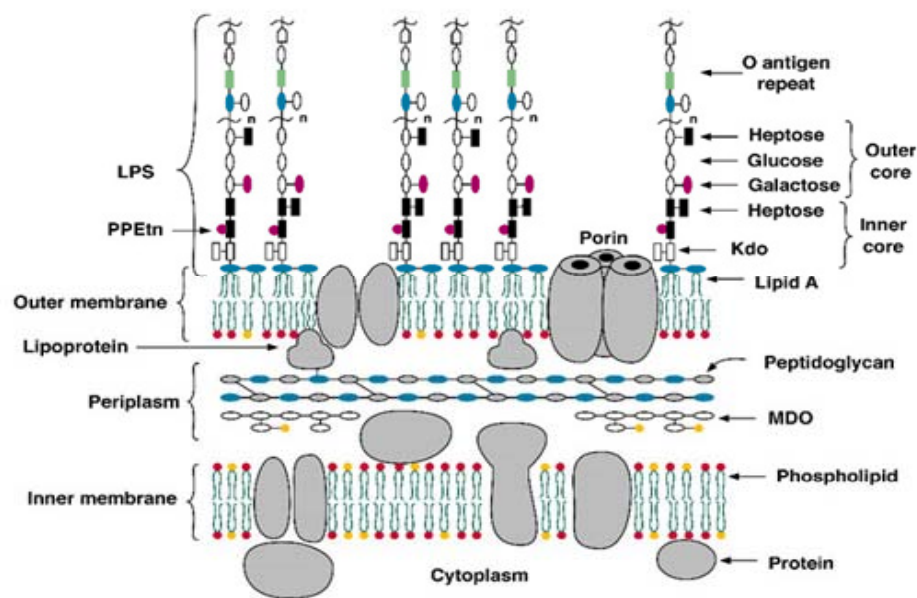
Rod *Oscillatoria*



Rod *Schizothrix*

LIPOPOLISAHARIDNI ENDOTOKSINI (LPS) - iritirajući toksini

- Lipopolisaharidi su generalno prisutni u spoljašnjoj membrani Gram negativnih bakterija, uključujući i cijanobakterije, gde formiraju komplekse sa proteinima i fosfolipidima i ispoljavaju toksičan efekat u smislu iritacije kože i očiju, alergijske reakcije tkiva, gastroenteritisa, inflamatornih problema, groznice.
- Lipopolisaharidi cijanobakterija su termostabilni i nose O antigene i mogu delovati i kao promotori tumora .



Cijanotoksini i njihova akutna toksičnost (WHO, 1998)

Cijanotoksin	LD50 čistog toksina
Hepatotoksini	45-1000 µg/kg
Mikrocistin-LR	60 (25-125) µg/kg
Mikrocistin-YR	70 µg/kg
Mikrocistin-RR	300-600 µg/kg
Nodularin	30-50 µg/kg
Neurotoksini	
Anatoksin-a (alkaloid)	250 µg/kg
Anatoksin-a (organofosfat)	40 µg/kg
Saksitoksini	10-30 µg/kg
Citotoksini	
Cilindrospermopsin	200 µg/kg/ nakon 5-6 dana

Poređenje toksičnosti cijanobakterijskih toksina sa drugim vrstama biotoksina (Falconer i sar. 1999)

Toksin	Vrsta- producent	Letalna doza (LD ₅₀)*
BOTULIN	<i>Clostridium botulinum</i> (bakterija)	0,00003
TETANUS	<i>Clostridium tetani</i> (bakterija)	0,0001
RICIN	<i>Ricinus communis</i> (biljka)	0,02
DIFTERIA TOKSIN	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (bakterija)	0,3
KOKI TOKSIN	<i>Phyllobates bicolor</i> (žaba)	2,7
TETRODOTOKSIN	<i>Sphaeroides rubripes</i> (riba)	8
SAKSITOKSIN	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (cijanobakterija)	9 
COBRA TOKSIN	<i>Naja naja</i> (kobra)	20
NODULARIN	<i>Nodularia spumigena</i> (cijanobakterija)	30-50 
MIKROCISTIN-LR	<i>Microcystis aeruginosa</i> (cijanobakterija)	50 
ANATOKSIN-a	<i>Anabaena flos-aquae</i> (cijanobakterija)	200 
MIKROCISTIN-RR	<i>Microcystis aeruginosa</i> (cijanobakterija)	300-600 
CURARE	<i>Chondodendron tomentosum</i> (brazilska biljka)	500
STRIHNIN	<i>Strychnos nux-vomica</i> (biljka)	500
AMATOKSIN	<i>Amanita phalloides</i> (gljiva)	600
MUSKARIN	<i>Amanita muscaria</i> (gljiva)	1100
FALATOKSIN	<i>Amanita phalloides</i> (gljiva)	1800
GLENODIN TOKSIN	<i>Peridinium polonicum</i> (dinoflagelatna alga)	2500
CIJANID		10000

* Akutna LD50 izražena u µg po kg telesne težine, na osnovu intra-peritonealnog injektiranja miševa

Od svih poznatih cijanobakterijskih toksina, ciklični peptidi predstavljaju najveći problem za ljudsko zdravlje, ne samo zbog mogućnosti akutnog trovanja, već i zbog potencijalnog rizika od izlaganja duže vreme manjim koncentracijama toksina u izvorima za vodosnabdevanje.

- **Najpoznatiji slučajevi trovanja:**

- U SAD-u 1931. - masovno trovanje 5000-8000 ljudi koji su se snabdevali vodom za piće iz reka Ohio i Potomak u kojima je došlo do masovnog razvoja vrsta roda *Microcystis*.
- U Australiji je 1979. - trovanje 140 dece usled korišćenja vode iz akumulacije za vodosnabdevanje sa prenamnoženom toksičnom cijanobakterijskom vrstom *Cylindrospermopsis raciborskii*.
- U Bahii u Brazilu 1988. - trovanje 2000 ljudi usled korišćenja vode za piće sa prisustvom cijanotoksina, 88 bilo sa letalnim efektom.
- Najpoznatiji slučaj trovanja ljudi sa letalnim ishodom, poznat pod nazivom "**Karuaru sindrom**", desio se takođe u Brazilu 1996. godine kada je za hemodijalizu pacijenata korišćena voda iz rezervoara u kojem je došlo do cvetanja cijanobakterija (koncentracija mikrocistina bila je 19.5 µg/l)- od posledica trovanja cijanotoksinima umrlo 75 pacijenata (55%).

Cijanotoksini su uvršteni u listu kritičnih kontaminenata (CCL-2) svetske agencije za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency - EPA).

Hronično izlaganje pojedinim grupama cijanotoksina, kao što je slučaj sa mikrocistinima, može dovesti do pojave karcinoma, što je uslovilo da Internacionalna agencija za istraživanje kancera (IARC) toksin mikrocistin-LR klasifikuje u 2B grupu supstanci (moguće karcinogene supstance za čoveka) (IARC 2006).

- S obzirom da cijanotoksini mogu biti letalni u relativno malim količinama, svaka pojava cvetanja cijanobakterija u vodi se mora posmatrati kao potencijalna opasnost po živi svet.
- Takva pojava u vodama za vodosnabdevanje predstavlja posebnu opasnost po ljudsko zdravlje, što ukazuje na važnost procene zdravstvenog rizika.
- U tu svrhu mogu da se koriste različiti prilazi i jedan od takvih, Health Risk Assessment (HRA-Procena zdravstvenog rizika) razvijen je od strane Američke Nacionalne naučne akademije, a prihvaćen je i primenjen osim u SAD-u još i u Australiji.

Identifikacija opasnosti

- Koje su vrste cijanobakterija prisutne u vodi?
- Koja je koncentracija ćelija u vodi sa različitih mesta uzorkovanja?
- Da li su neke vrste potencijalno toksične i ukoliko jesu, da li produkuju toksine i koja je količina toksina ?
- Ukoliko je voda namenjena za korišćenje moraju se odrediti brojnost ćelija i nivo toksina u izvoru i u vodi nakon odgovarajućeg tretmana.

Izlaganje riziku

Da li su ljudi izloženi opasnosti?
Koji su putevi izlaganja?

Izlaganje tokom rekreacije

Za koje aktivnosti se voda koristi?

Izlaganje u domaćinstvu

Da li se voda koristi za piće, kupanje, kuvanje?

Da li je primenjeni tretman pogodan za uklanjanje ćelija i toksina iz vode?

Da li je moguće proceniti stepen rizika kojem su ljudi izloženi?
Da li postoje neki negativni efekti korišćenja vode koji su prijavljeni?
Da li je neko posebno izložen visokom riziku?

Rizične doze

Verovatnoća za pojavu po zdravlje negativnih efekata

Vode za rekreaciju
neverovatna
moguća
verovatna

Ćelije/ml
<2000
>20.000
>100.000

Voda za piće
neverovatna
raste sa koncentracijom
i dužinom izlaganja

Toksin: ADWG je odredio dozvoljenu koncentraciju za mikrocistin-LR u vodi za piće koja iznosi 1.3 µg/l

Karakterizacija rizika

Ukupni rizik je baziran na koncentraciji ćelija i/ili toksina, stepenu tj. obimu cvetanja/kontaminacije, tipu aktivnosti za koje se voda koristi i kontakta koji ljudi mogu imati sa vodenom sredinom

Rezime WHO direktive za cijanobakterije u vodama namenjenim za vodosnabdevanje

Nivo upozorenja	Stanje – gustina algalnih ćelija	Aktivnosti
Opreznost (opasnost niskog stepena)	200 ćelija cijanobakterija/ml	uslovi koji ne dovode do cvetanja, cijanobakterije se detektuju u malom broju, nedeljni monitoring
1 (opasnost srednjeg stepena)	2000 ćelija/ml ili 1 µg/l hlorofila a sa dominacijom cijanobakterija	trend kretanja ka povećanom broju ili održavanju srednjeg broja cijanobakterija voda može biti neupotrebljiva za piće bez predhodne obrade u izvorima za vodosnabdevanje uvodi se testiranje toksina, naročito ukoliko su u uzorku najdominantnije poznate toksične vrste-ponavljati nedeljno analize nizak rizik za iritaciju kože i gastrointestinalne probleme kroz kontakt tokom aktivnosti u vodi (plivanje i dr.) kontinuirano nedeljno određivanje brojnosti cijanobakterija i davanje izveštaja javnosti
2 (opasnost visokog stepena)	100.000 ćelija/ml ili 50 µg/l hlorofila a sa dominacijom cijanobakterija	stalno visok broj potencijalno toksičnih cijanobakterija u vodi i/ili vidljivo lokalizovane formirane nakupine voda je neupotrebljiva za piće bez predhodnog odgovarajućeg tretmana uvodi se testiranje toksina i/ili vrši se nedeljno nedeljno uzimanje uzorka i određivanje broja cijanobakterija ukoliko je moguće treba zameniti izvor snabdevanja vodom povećan rizik od negativnih efekata po ljudsko zdravlje šire medijsko izveštavanje javnosti

Metode detekcije cijanotoksina

Opšte metode	Posebne metode
<u>MIKROCISTINI</u> bioeseji (npr. miševi, <i>A. salina</i>) PPIA ELISA	HPLC-PDA LCMS (/MS)
<u>CILINDROSPERMOPSIN</u> bioeseji ELISA	HPLC-PDA LCMS
<u>ANATOKSIN-A</u> bioeseji ELISA*	HPLC-FD LCMS
<u>PST toksini</u> bioeseji ELISA*	HPLC-FD LCMS

Istraživanja cijanobakterijske populacije i njihovih metabolita su veoma kompleksna i podrazumevaju uvođenje monitoring koji se, prema Chorus i Cavalieri (2000) sastoji od nekoliko faza:

- **I faza** se uvodi zbog moguće pojave masovnog razvoja cijanobakterija i pojave cijanotoksina u vodi;
- **II faza** koja se sprovodi u cilju ispitivanja indikatora prisustva potencijalno toksičnih i toksičnih cijanobakterija vizuelnom inspekcijom;
- **III faza** podrazumeva kvalitativnu i kvantitativnu procenu proliferacije toksičnih cijanobakterija i kvantitativno određivanje cijanobakterijske biomase;
- **IV faza** obuhvata kvalitativnu i kvantitativnu analizu specifičnih grupa cijanotoksina i procenu zdravstvenog rizika.

Naša iskustva:

Trenutno se u Mikrobiološkoj laboratoriji Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad i u Imunološkoj laboratoriji Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici rade analize:

- Mikrocistina i saksitoksina-ELISA test
- Mikrocistina i saksitoksina-HPLC metoda
- Mikrocistina-PP1 esej
- Mikrocistina-NMR
- Ukupni cijanotoksini-esej sa ćelijskim linijama

zorica.svircev@dbe.uns.ac.rs



A microscopic image of a filamentous cyanobacterium. The filament consists of a series of dark, oval-shaped cells. One cell in the center of the filament is significantly larger and lighter in color, indicating it is a heterocyst. The background shows other cellular structures and fibers.

HVALA NA PAŽNJI!