Neue Entwicklungen zu Cyanobakterientoxinen

Ingrid Chorus

Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*

- **akut letale Dosis durch Amatoxin:**
- **≥ 30-50 g Pilz**

Cyanobacterien

- **Letale Dosis durch Microcystin:**
- **≥ 50 g Zellbiomasse**

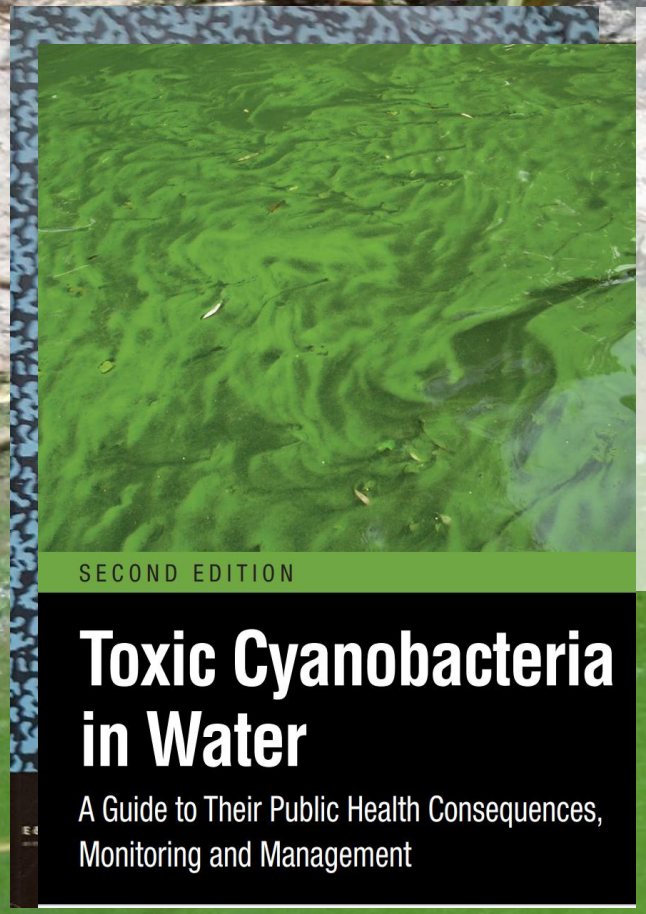
Toxizität relativ zu der anderer Biotoxine [µg/kg Körpergewicht von Maus oder Ratte]

Toxin	**LD_{50} i.p.**	**LD_{50} oral**
Botulinum A	0,004	30
Curare	2	
Saxitoxin	**10**	**260**
Anatoxin-a(s)	**20**	
Microcystin-LR	**50**	**5000**
Cobra toxin	75	
Amanitin (Knollenblätterpilz)	100 - 400	~ 100
Anatoxin-a	**350**	**> 5000**
Strychnine	1000	16000
Cylindrospermopsin	**2100 (200, 7d)**	**5000**

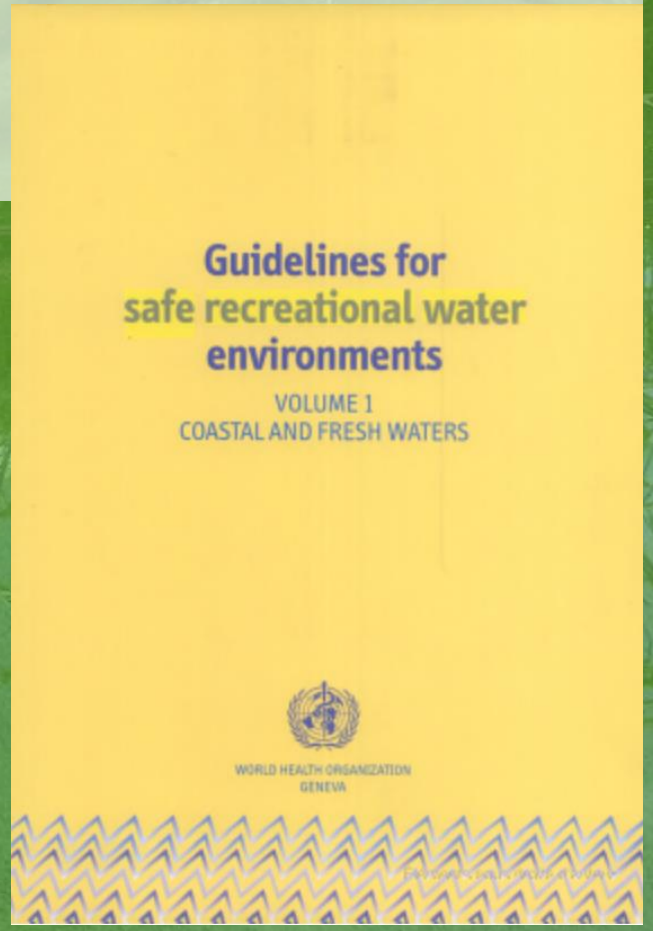
www.toxnet.nlm.nih.gov

Cyanobacterientoxine: Was ist neu seit 1998/1999

1. WHO Leitwert für Microcystin-LR im Trinkwasser (1998)
2. „Guidebook“ dazu (1999)
3. Kapitel 7 „Algae and Cyanobacteria in Coastal and Estuarine Waters“



2021: alles neu!
- **Leitwerte**
- **„Guidance“**



1. Neue WHO Leitwerte

2020: Motivation für Kurzzeitwerte – die für andere Stoffe im Trinkwasser bei der WHO fehlen?

Toledo, 2014: Untersuchung auf MCs seit 2012; Messungen im Sommer 2014: **1,7 µg/L**

➔ „no drink advisory“:

halbe Million Einwohner:

nicht kochen, nicht duschen,

manche Restaurants, Geschäfte,

Schulen geschlossen

Maßnamen: Pulverkohle und Fällung mit Al-Salzen; Chlorung;

➔ **Ertüchtigung der Aufbereitung**

➔ **WHO: „short-term“ guideline values werden gebraucht, um Missverständnisse zu vermeiden!**

1. Neue WHO Leitwerte

1998: Leitwert nur für Trinkwasser und nur für Microcystin-LR

https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/microcystin/en/

Toxin	Trinkwasser Lebenszeit	Trinkwasser Kurzzeit (≤ 2 Wo.)	Drinking-water acute	Freizeit-nutzung / Baden
	60 kg		5 kg baby	15 kg child
MCs	1	12		24
CYN	0.7	3		6
ATX	Daten unzureichend für Grenzwertableitung		30*	60*
STX			3	30

*health-based reference value; kein Grenzwert

Für Veröffentlichung: Auschau halten auf: https://www.who.int/water_sanitation_health/water-quality/guidelines/chemicals/en/

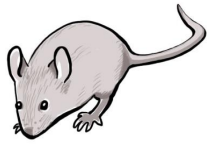
Herangehensweise zur Ableitung der WHO Leitwerte

1. *Epidemiologische Daten (akut und chronisch)*
2. Daten aus Toxizitätstests im Labor *in vivo* (Tierversuche)
3. *Daten aus in vitro Laborstudien (Zellinien, Transporter, Enzyminhibierung,… (adressieren einzelne Mechanismen der Toxizität)*

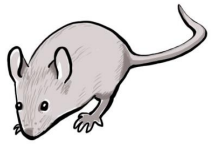
- Substanzen **mit Wirkungsschwelle** (80-90 % der im Trinkwasser regulierten Stoffe)
- Stoffe ohne Wirkungsschwelle (meist gentoxische Karzinogene)

Lange Zeit nahezu keine Tierversuche zu Cyanotoxinen publiziert:

Für CYN fehlte eine zweite unabhängige Studie zu der von Humpage & Falconer (1992); nunmehr Chernov et al. 2018



Substanzen mit Wirkungsschwelle



Dosis mit ausgeprägtem Effekt

Dosis mit deutlichem Effekt

Dosis mit geringem Effekt

Kontrolle

NOAEL

← No Observed Adverse Effect Level

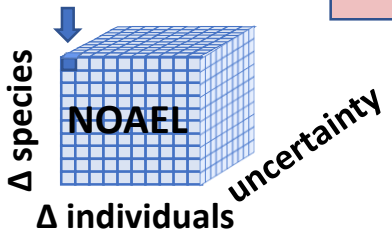
Substanzen mit Wirkungsschwelle Microcystin-LR

Fawell, J. K., James, C. P., & James, H. A. (1994). *Toxins from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water*. Foundation for Water Research.

Dosis mit ausgeprägtem Effekt: 1000 µg / kg Körpertewicht / d

Dosise mit Geringem Effekt: 200 µg/kg KG d

Tolerable Daily Intake TDI



NOAEL: No Observed Adverse Effect Level: 40 µg / kg bw d

TDI = NOAEL / 1000

DW Guideline value = TDI x bw x P / L = 0.04 x 60 x 0.8 / 2 = 1 µg/L

1. Neue WHO Leitwerte

Ableitung aus TDI – Beispiel MCs:

$$GV_{chronic} = \frac{NOAEL * bw * P}{UF * C} = \frac{40 * 60 * 0.8}{1000 * 2} \mu g/L = 0.96\ \mu g/L \approx 1\ \mu g/L$$

$$GV_{short-term} = \frac{NOAEL * bw * P}{UF * C} = \frac{40 * 60 * 1}{100 * 2} \mu g/L = 12\ \mu g/L$$

$$GV_{recreation} = \frac{NOAEL * bw}{UF * C} = \frac{40 * 15}{100 * 0.25} \mu g/L = 24\ \mu g/\ L$$

Annahmen für Körpergewicht: 60 kg für Erwachsene; 15 kg für Kind bei „recreation“

Aufnahmen: von 2 L Trinkwasser pro Tag; 250 mL Wasser für Kind bei „recreation“

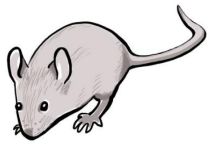
UF (uncertainty factor): 10*10*10 für chronic; 10*10 für „short-term“ und „recreation“

Herangehensweise zur Ableitung der WHO Leitwerte

1. *Epidemiologische Daten (akut und chronisch); Fallbeispiele*
2. Daten aus Toxizitätstests im Labor *in vivo* (Tierversuche)
3. *Daten aus in vitro Laborstudien (Zellinien Enzyminhibierung,… (addressieren unismen der Toxizität)*

Lange Zeit nahezu keine Ti Cyanotoxinen publiziert:

Für CYN fehlte ein angige Studie zu der von Humpage &



- Subs **Wirkungsschwelle** (80-9 der im Trinkwasser regulierten Stoffe)
- Stoffe ohne Wirkungsschwelle (meist gentoxische Karzinogene)

Worin bestehen die Probleme bei der Nutzung von Fallbeispielen und epidemiologischen Daten?

Epidemiologische Daten (akut und chronisch); Fallbeispiele

Fragwürdigkeit:

- Expositionsschätzung retrospektiv: Dosis fast nie auch nur annähernd bekannt;
- Berichtete Symptome (allgemeine: Übelkeit, Diarrhoe, Irritation von Haut, Schleimhäuten…) passen eher nicht zu denen durch die bekannten Cyanotoxine (eher erhöhte Leberenzymwerte; Sehstörungen; Kribbeln…)
- Nachweis von Toxinen im Serum bestätigt Exposition qualitative; quantitative ist nicht bekannt, wie sich Konzentrationen im Serum zur Wirkung im Organismus verhalten.

Studien untersuchen selten auf Viren, Parasiten, Erreger über Indikatorkeime hinaus

➔ Publikationen über "*confirmed cases*" und "*probable cases*", Cyanotoxinen zugeschrieben, übersehen vielleicht die tatsächliche Ursache!

Unerklärte Toxizität von Cyanobacterien – Wirkstoffe unbekannt

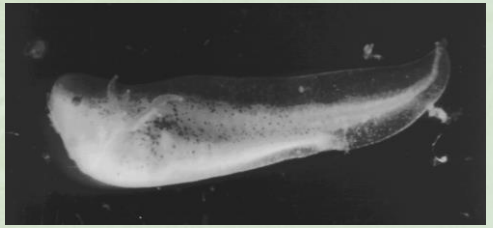
Immer wieder Hinweise auf Effekte, die nicht mit den bekannten Cyanotoxinen erklärbar sind; obwohl keine neuen seit 1992 identifiziert:

Beispiel: Oberemm, 1998: Misbildungen von Embryonen durch Exposition mit Rohextrakten von *P. agardhii / A. flos-aquae* (0.1 - 0.01 % TG / Wasservolumen)

controls | exposed

zebrafish (*Danio rerio*)

axolotl (*Ambystoma mexicanum*)



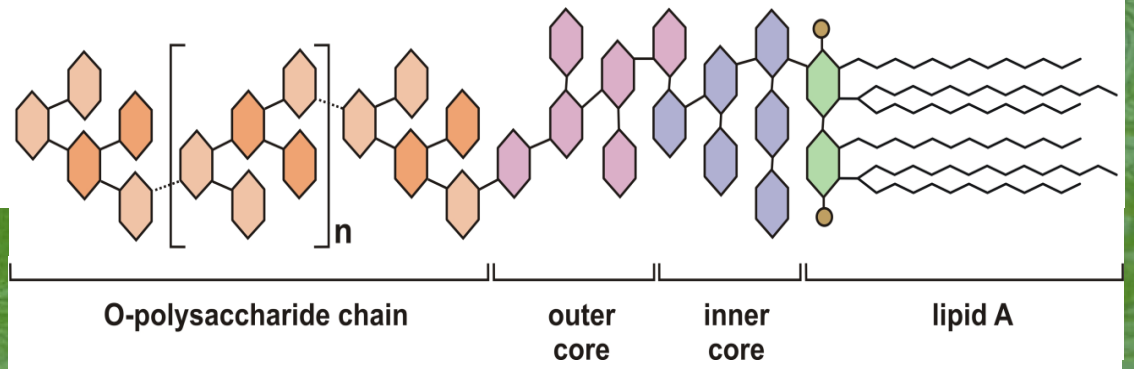
2. Klarstellungen in *Toxic Cyanobacteria in Water*

<u>Sind LPS Cyanotoxine</u>? Strukturell sehr diverse Gruppe; bekannt als eigentliche Ursache von Salmonellenvergiftungen

LPS aus Cyanobacterien nur für wenige Cyanobacterienarten characterisiert; werden auch "Endotoxin" genannt, weil zellgebunden (andere Cyanotoxine aber auch), aber:

> *"Arguably, LPS is not a secondary metabolite like the known cyanotoxins, and LPS is a highly variable fraction of a cellular constituent rather than a defined structure."* (TCiW 2021)

- Toxizität durch massive Abwehrreaktion im Blutkreislauf, aber: Salmonellen vermehren sich im Menschen; Cyanobakterien nicht !
- No clear evidence of toxicity to mammals!



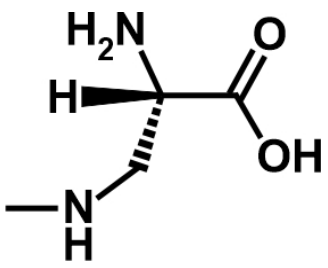
Struktur aus <u>Toxic Cyanobacteria in Water</u>

Lippy & Erp (1976) vielfach falsch zitiert; Hindman et al. (1976) hatten nicht auf andere Bakterien untersucht!

2. Klarstellungen in *Toxic Cyanobacteria in Water*

BMAA: Sehr einfache Aminosäure; viele Berichte mit zu unspezifischen Methoden!

- BMAA in Gehirnen gestrandeter Delphine: bis 748 µg/g aus LC-FLD berichtet; Bestätigung durch MS fand aber nur 0.6 µg/g (dies steht aber nur im *supplementary material* !)
- Weit verbreitetes Vorkommen wird aus LC-FLD Daten postuliert, ist aber durch neuere selektivere analytische Methoden nicht bestätigt.
- Tierversuche zeigten bei realistsichen Expositionen keine Effekte.
- Konzentrationen im Gehrin verstorbener Patienten mit ALS oder Alzheimer zeigten, wenn mit geeigneten Methoden untersucht, keine Evidenz erhöhter of BMAA-Konzentrationen.
- Wie könnte EINE Verbindung die Ursache sein für "*four distinctive neurological diseases affecting different regions of the brain and having different proteins associated with the central nervous system changes*"?
(Chernoff et al., TCiW, in print)



Struktur aus Toxic Cyanobacteria in Water

3. Wissensstand als Grundlage für Regulierung

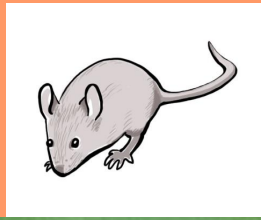
→ Seit Cylindrospermopsin in 1992 keine neuen Gruppen an Cyantoxinen gefunden;

→ Aber: Bioassays mit Rohextrakten aus Cyanobakterien zeigen Effekte, die nicht auf die bekannten Cyanotoxine zurückzuführen sind;

→ Weitere „Kandidaten“ – LPS and BMAA – nicht als relevante Cyanotoxine bestätigt.

Fazit für unser Verständnis der Cyanotoxine:

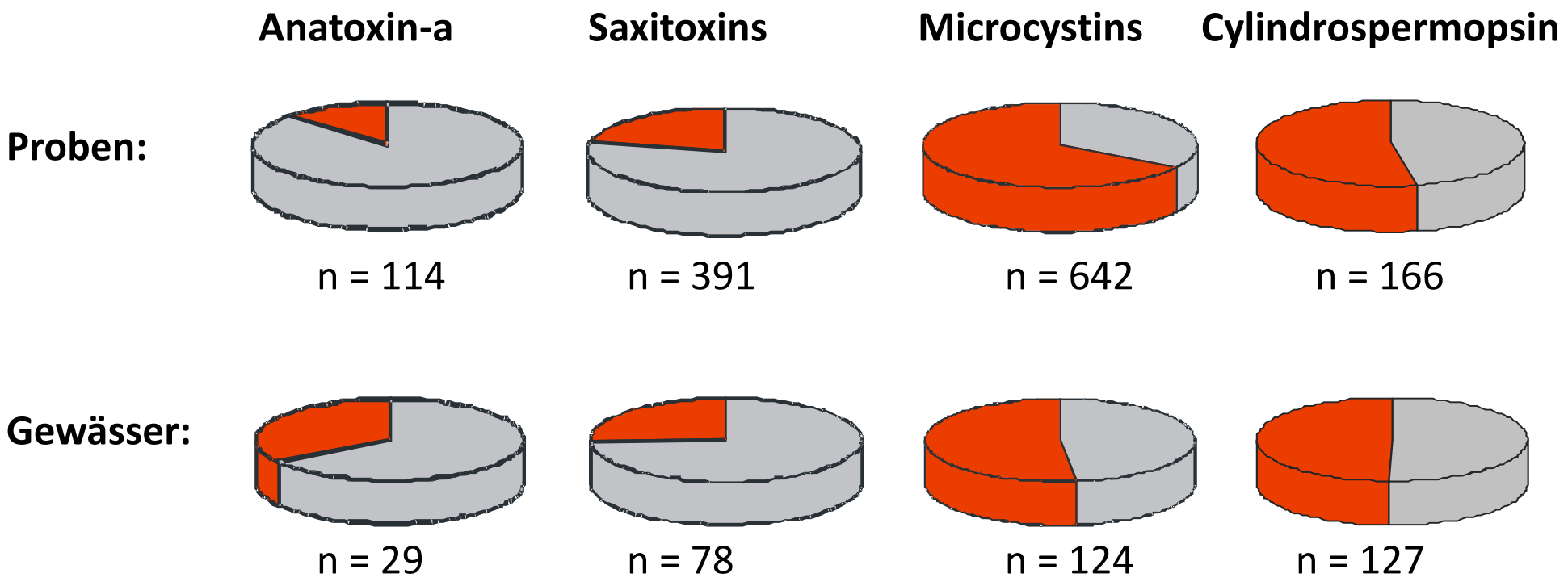
- Kennen wir doch die wichtigsten Gruppen?
- Bioassay-gestützte Isolation of bioaktiver Substanzen aus Rohextrakten – selbst aus Kulturen – ist aufwändig; Zeitbedarf >> typische Projektdauer.
- Geht es ohne Tierversuche?
  Für die Ableitung von Grenzwerten noch lange nicht!



4. Folgen/Änderungen bei Umsetzung neuer WHO Leitwerte

Werden die neuen Leitwerte – so wir sie in Deutschland umsetzten – zu Einschränkungen führen?

4. Folgen/Änderungen bei Umsetzung neuer WHO Leitwerte



Surveys in Deutschland (ATX, STX und MCs in den späten 1990‘s, CYN in 2004)

⇨ Microcystins sehr häufig, wenn Cyanobakterien vorkommen

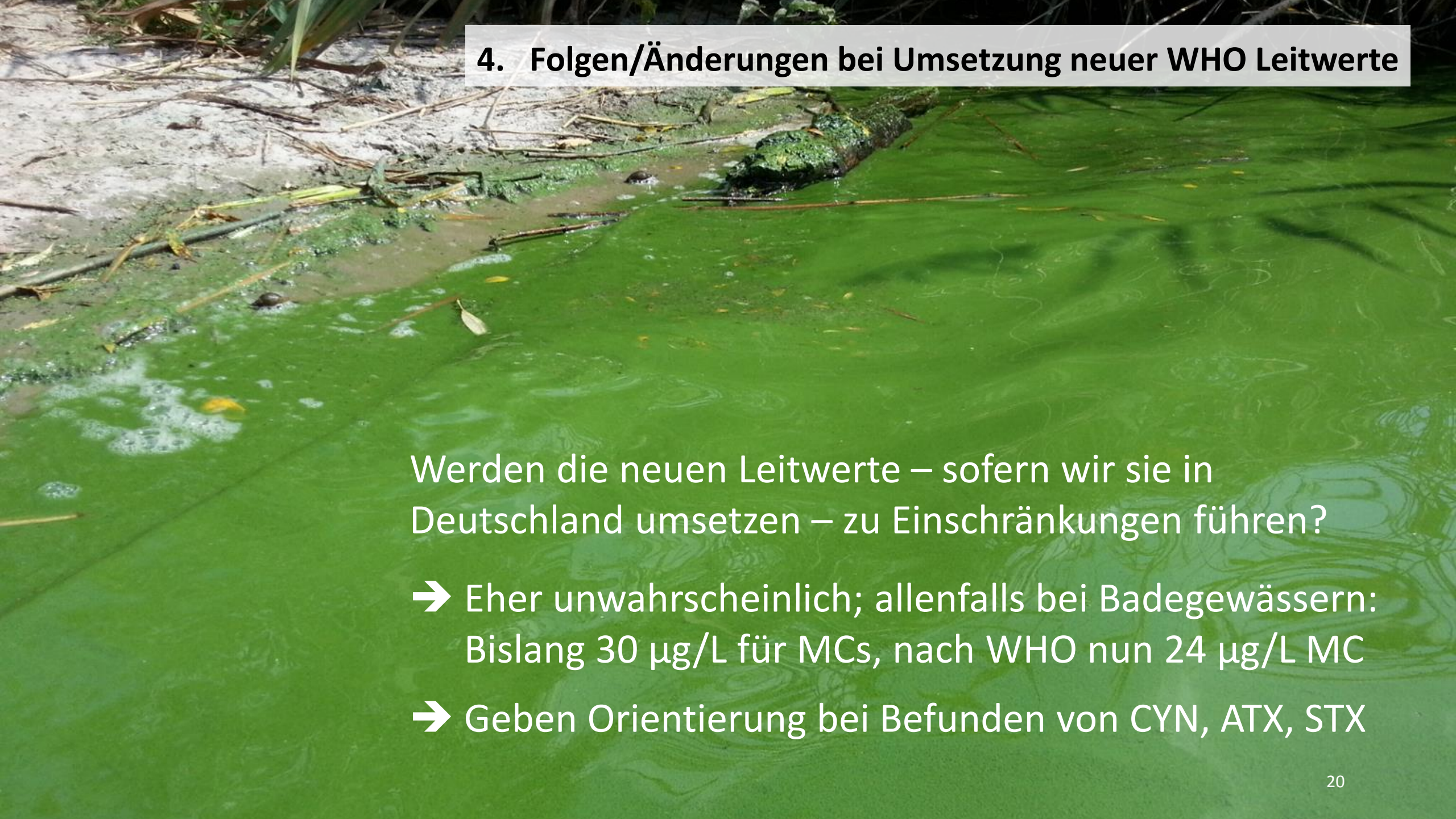
⇨ Cylindrospermopsin können ähnlich häufig vorkommen (aber bei geringen Konzentrationen)

⇨ Anatoxin-a und Saxitoxins weniger häufig

4. Folgen/Änderungen bei Umsetzung neuer WHO Leitwerte

	Vorkommen (Wahrschein-lichkeit)	Maximale Konzentrationen (plausibel) publiziert (bis 2019)					
		Im Wasser [µg/L]		Pro Biomasse-Einheit			pro Chlorophyll-*a* (bei Dominanz von Cyano-bakterien) [µg/µg]
		Gesamt	Anteil gelöst	Biovolumen [µg/mm³]	Zellquote [fg/cell]	Trocken-gewicht [mg/g]	
MCs	Meist bei *Mic*, *Pla*, auch *Dol.*/Anab.	< 10; in Blüten bis **100 000**	meist <<<	**5** (*Microcys***) **20** (*Pla*nktoth)	**550** (*Mic*) **850** (*Pla*)	**10** (*Mic*) **5** (*Pla*)	1:1 als „beinahe *worst-case estimate*“
CYN	Manchmal bei *Aphanizomenon*	meist **<< 10**; Extreme: **800*** **	Bis 90%; persistent	**3.5**	**280**	**10**	
ATX	Bei manchen Nostocales; bei keiner Art in der Regel zu erwarten	**1300**	meist <<	kaum Daten	**400**	**15**	
STX		**1000**	gelegentlich 40-100%	keine Daten	**1300**	**4.5**	

* Nach Algizid-Behandlung: 1800 µg/L; ** 14 in Laborkultur; ***weniger weil bei Nostocales schwächere „Blüten“!



4. Folgen/Änderungen bei Umsetzung neuer WHO Leitwerte

Werden die neuen Leitwerte – sofern wir sie in Deutschland umsetzen – zu Einschränkungen führen?

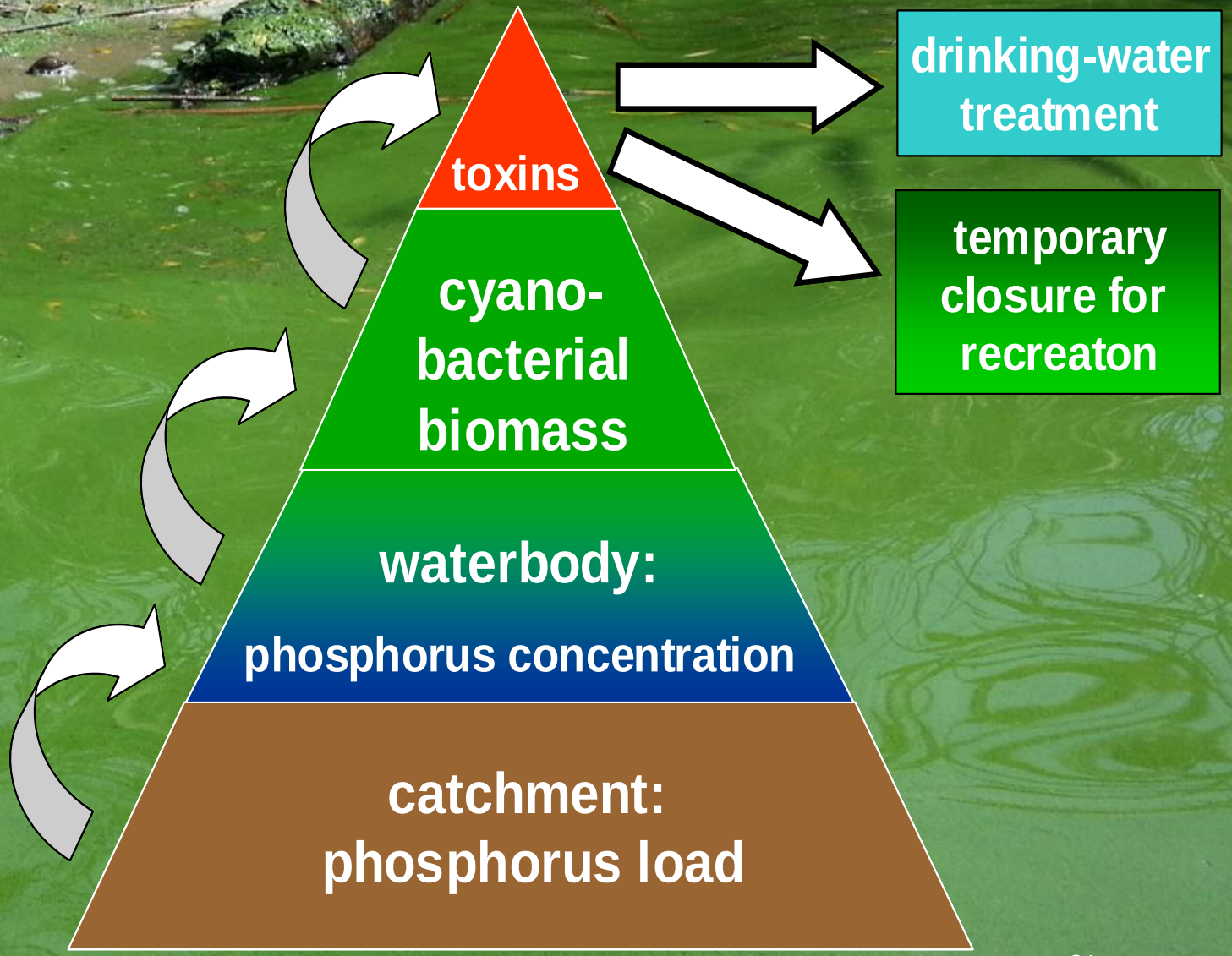
➔ Eher unwahrscheinlich; allenfalls bei Badegewässern: Bislang 30 µg/L für MCs, nach WHO nun 24 µg/L MC

➔ Geben Orientierung bei Befunden von CYN, ATX, STX

4. Wie das Vorkommen beherrschen? WHO dazu:

2 Ebenen:

1. Ansetzen an der Ursache
2. „End of Pipe“ → Aufbereitung; Einschränkung der Freizeitnutzung



Aus: Toxic Cyanobacteria in Water

Pre-screening water-bodies for elevated risk of blooms and exposure to cyanotoxins:

- Total phosphorus concentrations > 20 µg/L and/or experience of cyanobacterial occurrence
- Intensive recreational activity *(Section 5.2.3)*

Alternative or complementary entry points for assessment at intervals of about 2 weeks

Assessment by visual site inspection

fairly clear water, slightly turbid, greenish discoloration;
Secchi disc transparency < 1-2 m

yes

VIGILANCE LEVEL

yes

Assessment supported by lab analyses

microscopy showing dominance of cyanobacteria with up to 1 - 4 mm^3/L biovolume
or
up to 3-12 µg/L chlorophyll-a with dominance of cyanobacteria

Assess further characteristics determining its potential to support blooms or scums (Chapter 8)

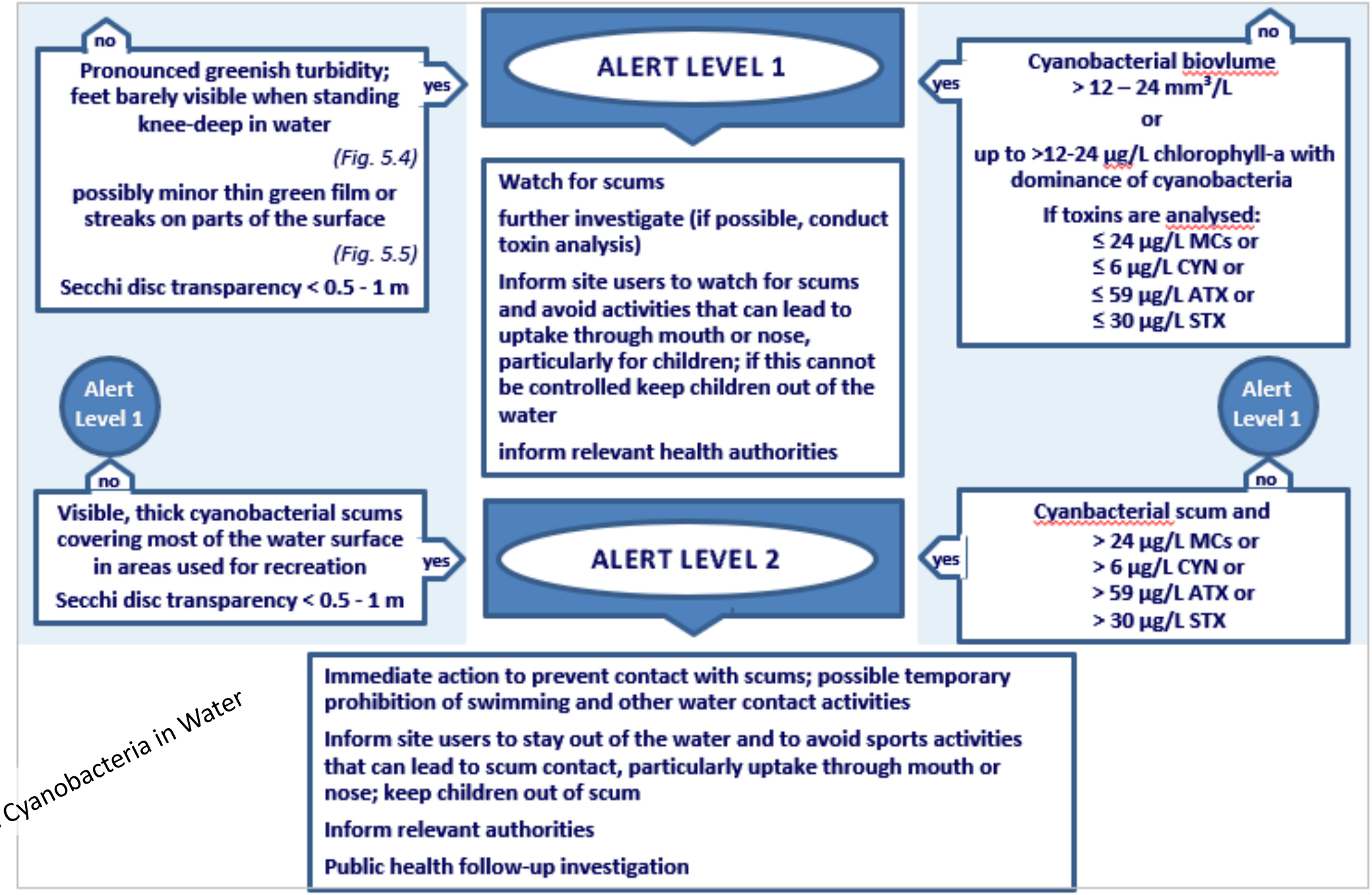
Assess for cyanobacteria known to be toxin producers *(Chapter 3)*

If present, intensify monitoring and/or inform site users about toxic cyanobacteria and how to recognize them *(Section 5.2.3; Chapter 15)*

Inform relevant authorities

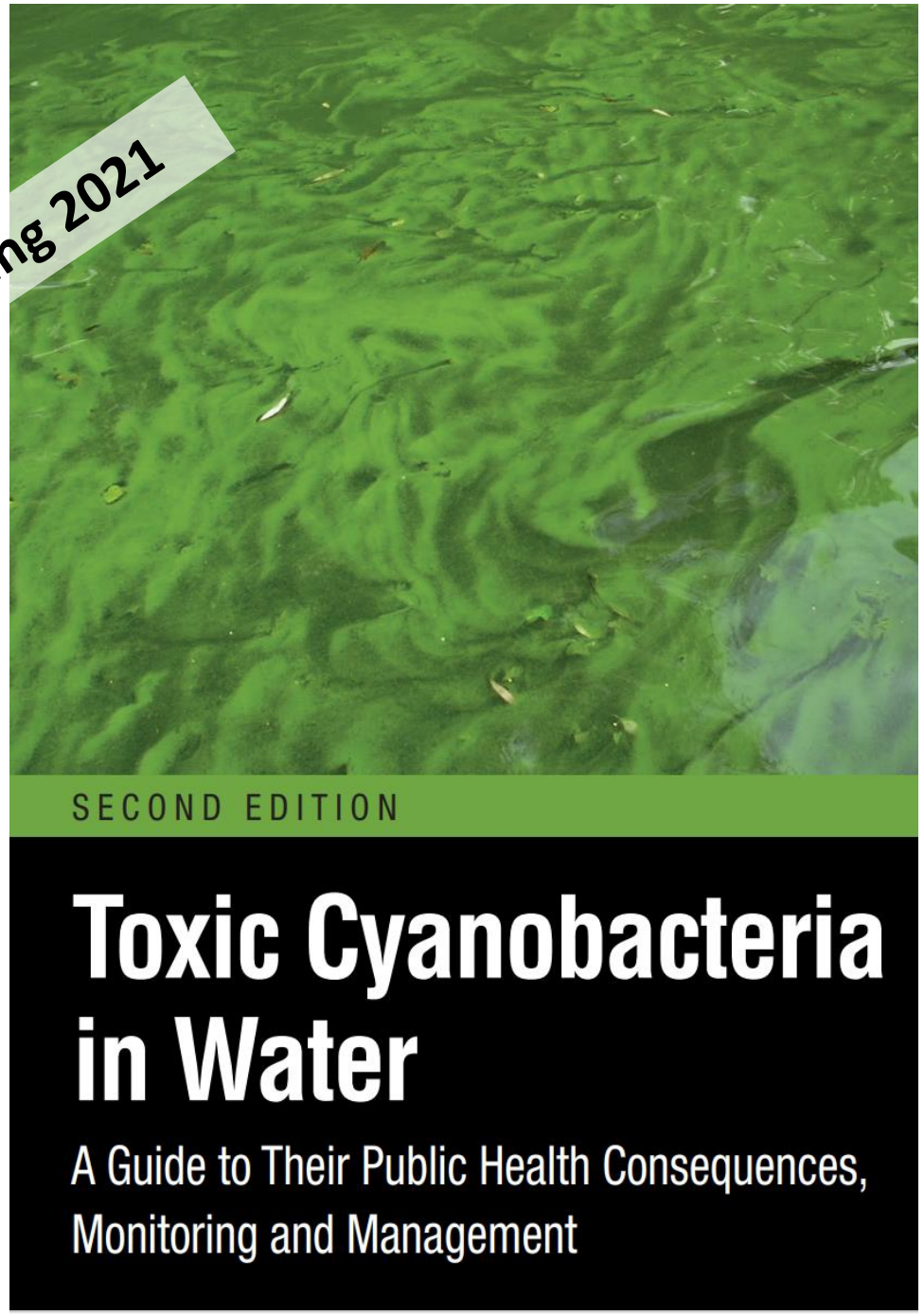
Vigilance Level

Vigilance Level



Aus: Toxic Cyanobacteria in Water

Anfang 2021



Understanding the hazard

Chapter 2: Introduction to cyanotoxins
Chapter 3: Introduction to cyanobacteria
Chapter 4: Occurrence of cyanobacteria and toxins

Chapter 5:

Preventing hazardous exposure to cyanotoxins

5.1: Drinking-water
5.2: Recreation and workplace
5.3: Food
5.4: Renal dialysis
5.5: Dietary supplements

Controlling cyanobacteria and cyanotoxin occurrence

Chapter 6: Assessing and managing risks

Chapter 7 Catchment
Chapter 8 Waterbody
Chapter 9 Sites of use
Chapter 10 Water treatment

Monitoring cyanobacteria and cyanotoxins

Chapter 11: Planning monitoring programmes
Chapter 12: Site inspection and sampling
Chapter 13: Analysing cyanobacteria and water chemistry
Chapter 14: Analysing cyanotoxins

Chapter 15: Public surveillance, communication and participation

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

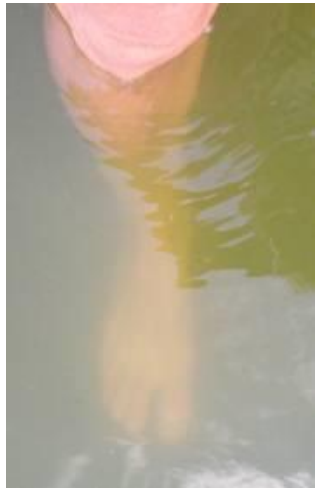
Und: Bleiben Sie gesund!
ingrid.chorus@gmail.com

Selbst-Einschätzung beim Baden

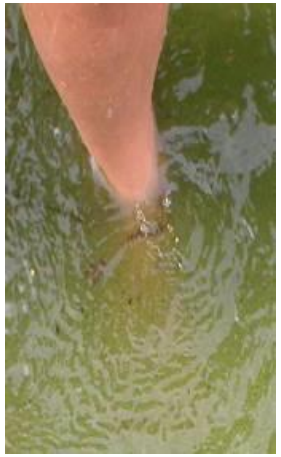
Three simple rules:

1. If water is greenish-turbid or covered with scum, avoid in particular swallowing any of it or ingesting droplets – e.g. jet-skiing or water-skiing!
2. Kids tend to swallow more water when romping around, and scums accumulate in shallow bays! Avoid that!
3. **Check yourself: wade in carefully up to your knees, without stirring up sediment. Can you still see your feet?**

→ **here swimming is OK !**



→ **don‘t swim here!**



Maybe the next bay, a few 100 m away, looks better!