

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

水產養殖環境有害藻華之毒素及毒理研究

Chemistry and Toxicology of Microalgal Toxins in Aquaculture Environment

計畫編號 ; NSC: 88-2312-B-002 -039

執行期限 ; 87 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人 ; 周宏農 國立台灣大學漁業科學研究所

一、中文摘要

建立本地有毒藻株的種源收集庫並開始其毒素與毒性分析，提供台灣本土紅潮及有害藻類活性物質的研究材料，在現有91株藻種中包含有部份同種之有毒與無毒藻株。由淡水水華微囊藻及分離培養之藻株 *Microcystis aeruginosa* MTN-2 純化有10種不同微囊藻毒，其中的MCYST-RA及[D-Asp]MYCST-FR, -WR為新化合物。在十二株微小亞歷山大藻 *Alexandrium tamarense* 中的九株發現含毒，且含毒藻株各有不同之毒素組成，其中一株之含毒量為目前所知同種中最高之一株。同時發現其含毒藻株與其所分離毒素本身均會在虱目魚之幼魚鰓部造成次級鰓板腫大及上皮細胞的剝離，因而提高其耗氧率及對臨界氧壓的需求，用以解釋養殖池中水華所導致虱目魚的死亡，過去文獻尚無此相關之發現。從原甲藻 *Prorocentrum lima*, *P. sp* 上分離有下痢性毒素之okadaic acid, DTX-1及其雙醇基醯化合物，包含一新雙醇基醯之黑海綿酸，另外純化有原甲藻大環內酯prorocentrolide, hydroxy-prorocentrolide及一結晶之新化合物命名為spiroprorocentrimine。

關鍵詞 ; 原甲藻大環內酯、微囊藻毒、螺接原甲藻大環內酯亞胺、麻痺性貝毒、利瑪原甲藻、微小亞歷山大藻、微囊藻。

Abstract

To establish a toxic microalgal culture collection in Taiwan to support further studies on red tide and harmful algal toxins. Among 91 clones of different species, there are toxic and nontoxic strains of the same species. Ten microcystins have been isolated from field collection of blooming population of *Microcystis aeruginosa* and strain MTN-2 of the same species. Three of the toxins are known to be new in literature. Among 12 *Alexandrium minutum* isolates there were 9 found to be toxic, and their toxin profiles were different. One of the strain, AmTK6a was known as the most toxic one ever reported. It was also found toxic cells of *A. minutum* and the purified toxin showed toxicity to milkfish larvae by damaging fish gills and thus causing a high demand and consumption of oxygen in fish. From one *Prorocentrum lima* isolate, okadaic acid, its diol esters, and DTX-1 were isolated. One of the diol ester of OA was known as new compound. Spiroprorocentrimine, a new compound was isolated and crystalized from the extract of one unknown *Prorocentrum* species, in addition to prorocentrolide and hydroxyprorocentrolide.

Keywords: prorocentrolide, microcystins, spiroporocentrimine, paralytic shellfish toxins, *Prorocentrum lima*, *Alexandrium minutum*, *Microcystis aeruginosa*.

二、緣由及目的

台灣四面環海，沿岸地區水產養殖蓬勃，及內陸水域之池塘、水庫等亦充分開發為養殖區，由於高度開發及缺乏管理，已造成養殖水域環境嚴重的優養化，因此容易產生水華或紅潮現象，當毒藻或是有害藻華發生時，則會危害其周遭環境的生物。目前更因國際間貿易的活絡，船舶所攜帶的壓艙水四處散佈交換，使得有害藻種的散佈與水華現象益形普遍，外來藻種可能在本地環境中帶來嚴重的危害與衝擊。國內水產品的供應，仰賴本地水產養殖甚鉅，養殖生物的成长與收穫又倚靠優良的環境。水中毒藻的存在以及其所含毒素，可能直接造成養殖生物的暴斃，或是藉由食物鏈的蓄積與傳遞，特別是濾食性貝類，引發水產食品中毒事件，有待深入研究其基礎生物與毒素化學，包括毒素及毒藻的偵檢、毒素標準品的建立、生理生態上的掌握等等，才能進行有效管理。

前曾研究結果顯示台灣西南沿海葉綠素量已較二十年前增加十倍，且存在有秋季藻華現象¹⁾，而在鹹或淡水養殖池與水庫中所發生的局部性藻華，如翡翠、石門水庫的藍綠藻華，德基水庫渦鞭毛藻所形成的醬油水等等已知有多年。過去在南台灣，曾發生數起因食用了含藻源毒素的貝類而造成民眾送醫甚至死亡的事件²⁾。而在最近針對麻痺性毒的國科會補助研究及農委會的調查計畫中，也發現到西南沿海彌陀、永安等地的魚池，因微小亞歷山大藻 (*Alexandrium minutum*) 毒藻水華造成養殖水產生物暴斃而損失慘重，並與西施貝的

水產食品中毒事件直接相關³⁻⁵⁾，但文獻上相關麻痺性毒在開放水域中水華造成魚群暴斃案例極少⁶⁾，所以本研究對不同分離株的該毒藻之形態、產毒類型、對魚之毒理機制與形成藻華之生理、生態條件等相關題目上，加以分析。

除已知的麻痺性毒外，國內前曾發生的水產食品中毒事件，也存在著下痢性藻毒與珊瑚礁魚毒，去年度將近八千人次的食品中毒，水產品佔了大半⁷⁾。1997年十月間在高雄就出現兩起魚毒中毒事件，而在貝毒方面，多起上吐下瀉伴隨部分神經性異常之海鮮集體中毒事件，除部分因細菌性污染所引起外，仍存在許多不知原因之中毒，很可能起源於藻類之生物毒，藉食物鏈之傳遞而存留於海鮮食品。本計畫亦針對本省四周海域所存在毒藻，尤其是養殖環境內之毒藻，藉藻體培養、毒性物質分析，建立其他可能引起養殖生物暴斃或水產食品中毒之微藻的相關科學資訊。

本研究工作：1. 持續收集並分離建立本省之有毒藻株，成立有毒及與其相關之無毒藻株的種源庫，以為後續的研究提供材料；2. 就已建有之藻株培養，挑出含毒藻株予以大量培養，抽取、純化毒性成份，並藉光譜、質譜解析其化學結構，比較其在藻體中生合成之相關；3. 依毒藻不同密度與所純化出毒素之不同濃度，測試幼魚對毒性的忍耐力及毒素對幼魚的毒害作用。

三、結果與討論

1. 藻株種源庫的建立

本研究中所建立的藻株培養，共有91株，分屬藍綠藻門的2屬2種，甲藻門的8屬22種，定鞭藻門的1屬1種，綠鞭藻門的1屬1種等不同的藻株(表一)，其來源包括由

本省西南沿海養殖池與北、南部珊瑚礁海域所採集單離的藻株及少部份香港大學與丹麥哥本哈根大學所交換來的藻種。其中大部分藻株均經過老鼠與豐年蝦之生物毒性測試，部份經高效液相層析分析其已知毒素(GTXs與MCYSTs)的組成。

2. 毒素的純化與鑑定及不同藻株間毒素組成的比較

利用所分離出之純毒與高效液相層析建立毒素組成分析系統比較各亞歷山大藻 *A. tamarense*, *A. minutum* 與微囊藻 *M. aeruginosa* 藻株的毒素組成，重要結果如圖一與表二，顯示各 *A. minutum* 藻株皆含有 GTX-1~4，但在各藻株內之含量與相對有很大差別。從利瑪原甲藻 *Prorocentrum lima* 之一株培養中分離出八種不同之黑海綿酸 okadaic acid (OA)及其衍生物，其中 OA, DTX-1, OA 甲基酯，及 OA 雙醇酯 OA-D8 和 OA-D9d 經由核磁共振及質譜分析確認。其中 OA-D9d 為新毒素。從該藻中亦分離有油溶之極性毒素 OH-prorocentrolide，而從另一株底棲之原甲藻分離出 prorocentrolide 及一結晶化合物 spiro-prorocentrimine, $C_{42}H_{69}NSO_{13}$ ，被證實屬新毒素，雖類似於已發表之原甲藻大環內酯，但具備螺接之雙環而不同於此類型已知之化合物。

3. 麻痺性藻毒對仔稚魚的毒性研究

以STX純毒、有毒和無毒之不同微小亞歷山大藻藻株及其毒藻萃出液處理虱目魚仔魚，探討麻痺性貝毒毒素與微小亞歷山大藻對魚類的毒害機制，發現當魚類受到麻痺性貝毒毒素的毒害時，會造成鰓部次級鰓板腫大及上皮細胞剝離，而提高耗氧率及對臨界氧壓的需求，若水中溶氧不足以供應其生理需求時，則造成死亡；此外，無毒的微小亞歷山大藻及其萃出液雖

不會造成虱目魚的鰓部受損，或影響虱目魚的耗氧量，但高濃度藻細胞 (2.1×10^4 cells/ml) 存在時，若不加以打氣以提供充分的溶氧，虱目魚亦會死亡，推測無毒的微小亞歷山大藻株對虱目魚存在有非麻痺性毒的其他毒理作用。

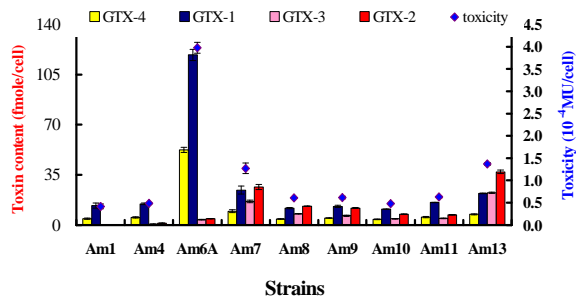
四、計畫成果自評

本計畫的成果主要有：1.初步建立台灣本土有毒微細藻藻株種源庫及各項毒素純質的獲得，為未來的研究提供材料及難以獲得得毒素標準品。2.建立微囊藻毒、下痢性毒之液相層析之定性定量分析系統，作為飲用水質與水產品檢測之依據。3.由多種微囊藻毒毒素純質與 MCYST-LR 之免疫交叉反應性的結合偏低，證實由單一MCYST-LR發展出來的免疫檢驗試劑組有可能低估樣品的含毒量。4.首次實驗證實麻痺性貝毒在水體中對魚類鰓組織造成緊迫性之組織破壞，自然界中若因打氣不良加以施藥殺藻造成更多毒素得釋出，可能引發更多養殖魚類的死亡。5.三種微囊藻毒，一種雙醇基黑海綿酸醯，二種原甲藻毒為新發現之藻毒。

五、參考文獻

1. 蔣國平,洪昇楓,吳瑞榮, 1997, 臺灣西南沿岸海域植物性浮游生物時空分布之研究, 臺灣省水產學會86年度論文發表會摘要集, p. 32.
2. 蘇惠美, 周宏農, 1993, 有害微細藻類與貝毒檢驗法, 農委會漁業特刊, 農委會, 臺北, 55p.
3. 陳逸民, 1995, 台灣本地數種微囊藻(microcystis)之微囊藻毒成份分析與結構鑑定, 國立台灣大學漁業科學研究所, 碩士論文。
4. 周宏農, 1997, 養殖水產品品質衛生監視及改善, 西南沿海養殖貝類麻痺性貝毒檢驗調查報告, 59p.
5. 陳治宇, 周宏農, 1997, 微小亞歷山大藻對於虱目魚毒害作用之研究, 臺灣省水產學會八十六年度論文發表會論文摘要集, p. 170.

7. 周宏農, 1997, 水產食品安全管理規劃：水產品藻毒的分析與監測(一), 行政院衛生署計畫報告, 34p.
8. Lee, T. H., Chen, Y. M. and H. N. Chou, 1998, First report of Microcystins in Taiwan, *Toxicon*, 36(2): 247-255.
9. Lee, T. H., Chen, Y. M. and H. N. Chou, 1999, Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay, *Acta Zoologica Taiwanica*, 10(1): 1-9.
10. Chen, C. Y. and H. N. Chou, 1998, Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins, from dinoflagellate to gastropod, *Toxicon*, 36(3): 515-522.



圖一：不同微小亞歷山大藻株之毒素組成

表一：研究中所收集建立之毒藻藻株培養

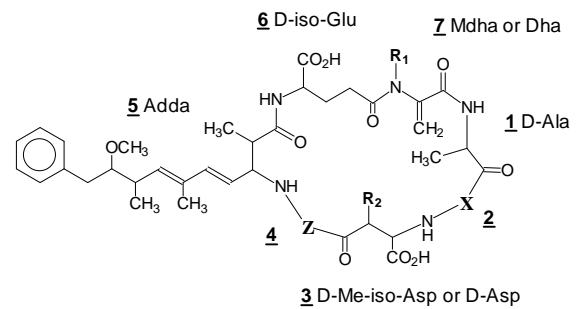
編號	藻種	代號	毒性	來源	註記
Dinoflagellates					
1	<i>Alexandrium tamarense</i>	ATHK01	A	香港	
2	<i>A. tamarense</i>	ATHK02	X	香港	
3	<i>Alexandrium minutum</i>	AM01	A	東港	aquaculture pond
4	<i>A. minutum</i>	AM04	A	東港	aquaculture pond
5	<i>A. minutum</i>	AM05	C	東港	aquaculture pond
6	<i>A. minutum</i>	AM5A	C	東港	aquaculture pond
7	<i>A. minutum</i>	AM06	C	東港	aquaculture pond
8	<i>A. minutum</i>	AM6A	A	東港	aquaculture pond
9	<i>A. minutum</i>	AM07	A	東港	aquaculture pond
10	<i>A. minutum</i>	AM08	A	東港	aquaculture pond
11	<i>A. minutum</i>	AM09	A	高雄	aquaculture pond
12	<i>A. minutum</i>	AM10	A	高雄	aquaculture pond
13	<i>A. minutum</i>	AM11	A	高雄	aquaculture pond
14	<i>A. minutum</i>	AM13	A	高雄	aquaculture pond
15	<i>Amphidinium carterae</i>	AC01	A, B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
16	<i>A. carterae</i>	AC02	A, B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
17	<i>A. carterae</i>	AC03	B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
18	<i>A. carterae</i>	AC04	A, B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
19	<i>A. carterae</i>	AC05	B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
20	<i>A. carterae</i>	AC06	A, B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
21	<i>A. carterae</i>	AC07	B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
22	<i>A. carterae</i>	AC08	B	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>

23	<i>A. carterae</i>	AC09	A	東港	epiphyte of <i>Caulerpa</i>
24	<i>A. carterae</i>	AC10	A	丹麥	
25	<i>A. carterae</i>	AK01	A, B	台南	sand, aquaculture pond
26	<i>Amphidinium</i> sp3	AP01	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
27	<i>A. sp3</i>	AP02	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
28	<i>A. sp3</i>	AP03	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
29	<i>A. sp3</i>	AP04	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
30	<i>A. sp3</i>	AP05	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
31	<i>A. sp3</i>	AP06	B	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
32	<i>Coolia monotis</i>	CM01	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
33	<i>C. monotis</i>	CM02	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
34	<i>C. monotis</i>	CM03	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
35	<i>C. monotis</i>	CM04	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
36	<i>C. monotis</i>	CM05	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
37	<i>C. monotis</i>	CM06	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
38	<i>C. monotis</i>	CM07	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
39	<i>C. monotis</i>	CM08	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
40	<i>C. monotis</i>	CM09	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
41	<i>C. monotis</i>	CM10	C	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
42	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	GT01	A	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
43	<i>G. toxicus</i>	GT03	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
44	<i>G. toxicus</i>	GT04	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
45	<i>G. toxicus</i>	GT05	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
46	<i>Gyrodinium instriatum</i>	GF01	B	東港	aquaculture pond
47	<i>G. instriatum</i>	GF02	B	東港	aquaculture pond
48	<i>G. instriatum</i>	GF03	B	東港	aquaculture pond
49	<i>G. instriatum</i>	GF08	X	東港	aquaculture pond
50	<i>Gyrodinium</i> sp1.	GY01	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
51	<i>Gyrodinium</i> sp2.	GY04	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
52	<i>Gyrodinium</i> sp3.	GY05	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
53	<i>Gymnodinium catenatum</i>	GCHK01	X	香港	
54	<i>Gymnodinium</i>	GMHK01	X	香港	
55	<i>Gymnodinium</i> sp.	YL01	X	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
56	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	OL01	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
57	<i>Prorocentrum lima</i>	PL01	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
58	<i>P. lima</i>	PL02	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
59	<i>P. lima</i>	PL03	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
60	<i>P. lima</i>	PL04	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
61	<i>P. lima</i>	PL05	A	野柳	epiphyte of <i>Sargassum</i>
62	<i>Prorocentrum</i>	PM03	C	台南	sand, aquaculture pond
63	<i>Prorocentrum minimum</i>	PM12	C	東港	aquaculture pond
64	<i>Prorocentrum tropicalis</i>	PT01	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
65	<i>P. sp1</i>	PM01	C	台南	sand, aquaculture pond
66	<i>P. sp1</i>	PM02	C	台南	sand, aquaculture pond
67	<i>P. sp1</i>	PM04	C	東港	aquaculture pond
68	<i>P. sp1</i>	PM05	A	東港	aquaculture pond
69	<i>P. sp1</i>	PM06	C	東港	aquaculture pond
70	<i>P. sp1</i>	PM07	A	東港	aquaculture pond
71	<i>P. sp1</i>	PM08	A	東港	aquaculture pond
72	<i>P. sp1</i>	PM09	A	東港	aquaculture pond
73	<i>P. sp1</i>	PM10	A	東港	aquaculture pond
74	<i>P. sp1</i>	PM11	A	東港	aquaculture pond
75	<i>Prorocentrum</i> sp2	PE01	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>

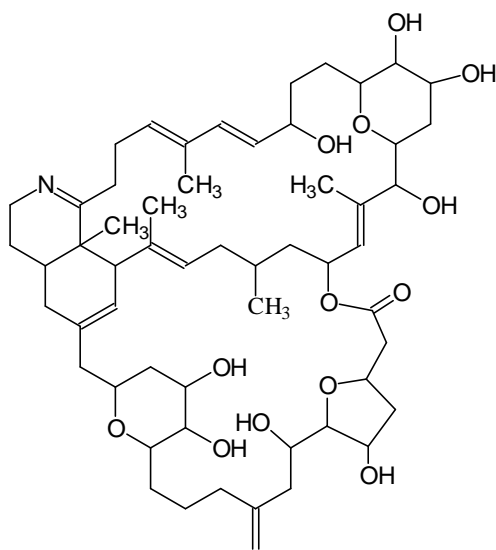
76	<i>P. sp2</i>	PE03	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
77	<i>Proocentrum sp3</i>	PU02	X	南灣	epiphyte of <i>Sargassum</i>
Haptophytes					
78	<i>Prymnesium parvan</i>	PP01	X	丹麥	
Raphidophytes					
79	<i>Heterosigma akashiwa</i>	HA01	X	丹麥	
Cyanobacteria					
80	<i>Microcystis aeruginosa</i>	MTY1	A	桃園	aquaculture pond
81	<i>M. aeruginosa</i>	MTY2	A	桃園	aquaculture pond
82	<i>M. aeruginosa</i>	MCY1	A	嘉義	aquaculture pond
83	<i>M. aeruginosa</i>	MTN1	C	台南	aquaculture pond
84	<i>M. aeruginosa</i>	MTN2	A	台南	aquaculture pond
85	<i>M. aeruginosa</i>	MTN3	A	台南	aquaculture pond
86	<i>M. aeruginosa</i>	MTN4	A	台南	aquaculture pond
87	<i>M. aeruginosa</i>	MTN5	X	台南	aquaculture pond
88	<i>M. aeruginosa</i>	MKS1	C	高雄	water reservoir
89	<i>M. aeruginosa</i>	MKS15	X	高雄	aquaculture pond
90	<i>M. aeruginosa</i>	MKS29	X	高雄	aquaculture pond
91	<i>Coelosphaerium kuetzingianum</i>	CTN1	C	台南	aquaculture pond

表二：不同微小亞歷山大藻株毒性與毒素組成分析

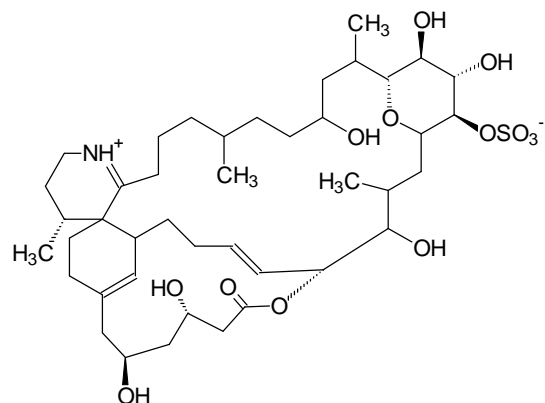
Culture strain	Toxin content (fmole/cell)	Toxicity STX eq. (fg/cell)	Dominant toxins (mole %)	
			GTX-1,4	GTX-3,2
AmTK1	18.29	10829	98.4	1.6
AmTK4	22.01	12507	91.5	8.5
AmTK6A	179.40	102981	95.4	4.6
AmTK7	76.92	32926	44.1	55.9
AmMT8	37.06	15781	43.1	56.9
AmMT9	36.19	15977	49.1	50.9
AmMT10	26.93	12456	55.8	44.2
AmYA11	33.13	16240	64.3	35.7
AmMT13	89.28	35452	33.2	66.8



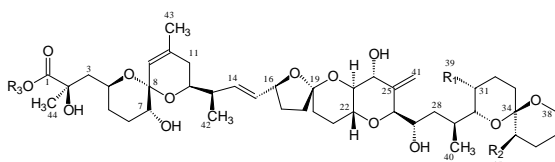
Microcystins	R ₁	R ₂	X	Z
1 MCYST-LR	CH ₃	CH ₃	L-Leu	L-Arg
2 MCYST-YR	CH ₃	CH ₃	L-Tyr	L-Arg
3 [Dha]MCYST-LR	H	CH ₃	L-Leu	L-Arg
4 [Dha]MCYST-RR	H	CH ₃	L-Arg	L-Arg
MCYST-FR	CH ₃	CH ₃	L-Phe	L-Arg
MCYST-WR	CH ₃	CH ₃	L-Trp	L-Arg
[D-Asp]MCYST-FR	CH ₃	H	L-Phe	L-Arg
[D-Asp]MCYST-WR	CH ₃	H	L-Trp	L-Arg
MCYST-RA	CH ₃	CH ₃	L-Arg	L-Ala
1 MCYST-RR	CH ₃	CH ₃	L-Arg	L-Arg



proocentrolide



spiroproocentrimine



5

COMPOUND	R ₁	R ₂	R ₃
Okadaic acid	CH ₃	H	H