

Fiskegiftige algetoksiner

Kendskabet til de fiskegiftige stoffer, der af og til forårsager massedød blandt fisk, er stadig begrænset, hvorfor det er svært at monitorere disse stoffer i havbrug og dambrug. Det strategiske projekt Harmful Algae Blooms and FISHkills (HABFISH) studerer denne gruppe af toksiner i et tæt samarbejde imellem forskere fra KU og DTU, og projektets nyeste resultater ser lovende ud.

Af Silas Anselm Rasmussen¹, Kristian Fog Nielsen¹, Per Juel Hansen², Thomas Ostenfeld Larsen¹
¹DTU, Bioengineering, ²KU, Marin Biologisk Sektion

Marine mikroalger er encellede organismer, der udgør fundamentet for den marine fødekæde. Mikroalger udnytter fotosyntesen og får derfor deres energi fra solen og kuldioxid. En del alger er dog mixotrofe og kan supplere fotosyntesen ved at optage bytte og samtidig få de nødvendige næringsalte.



Figur 1. Opdræt af regnbueørred, Hjarnø fiskefarm. På grund af den lange kystlinje og mange fjorde har Danmark en god geografi til et øget havfiskebrug.

Ligesom andre mikroorganismer, f.eks. bakterier og svampe, producerer mikroalger sekundære metabolitter, såsom signalstoffer og giftstoffer. Den eksakte biologiske rolle, som disse sekundære metabolitter spiller, kendes meget sjældent, men ud fra et økologisk perspektiv fungerer de ofte som et forsvar mod andre mikroorganismer i kompetitive marine miljøer. Nogle stoffer ender via fødekæden i større organismer, som får deres næring ved at indtage mikroalger.

De mest kendte humane algegiftstoffer er paralytisk skaldyrstoksiner (PST), diarréetisk skaldyrstoksiner (DST) samt de neurotoksiske skaldyrstoksiner (NST). Disse giftstoffer ophobes typisk i muslinger og transporteres videre i fødekæden til højere dyr (se faktaboks). Fra et naturstoffkemisk perspektiv har marine alger været en kilde til nogle af de mest komplekse og største (non-peptid) kemiske strukturer, man kender.

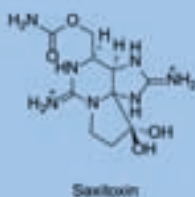
Fiskegiftige alger og havbrug/akvakultur

Gennem det sidste årti har der været en støt stigning i bidraget fra fiskeopdræt i dam- og havbrug til den globale fiskeproduktion, se figur 2. En af udfordringerne ved fiskeopdræt er, at visse typer af alger kan producere fiskegiftige stoffer (ichthyotoksiner), der ved en algeopblomstring kan dræbe en hel fiskebestand. Dette fænomen forekommer også i naturlige fiskebestande og er altså ikke nødvendigvis en sekundær effekt af en øget havbrugsproduktion. Senest har en giftig algeopblomstring været skyld i, at fiskefarmere i Chile har mistet over

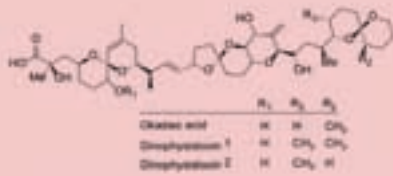
■ Struktur af giftstoffer

Strukturerne af PST, DST og NST. Disse giftstoffer ophobes for eksempel i muslinger og østers, og kan medføre forgiftning hos mennesker, hvis kontamineret skaldyr indtages.

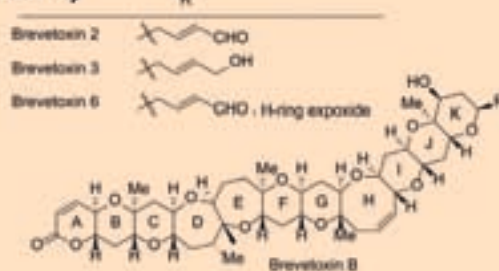
Paralytic Shellfish Toxins (PST)



Diarrhetic Shellfish Toxins (DST)



Neurotoxic Shellfish Toxins (NST)



24.000 tons laks, hvilket er svarende til godt 2% af hele Chiles årlige akvakulturproduktion. Lakseproduktionen i Norge har også været ramt i starten af 90'erne, hvor 750 tons opdrættet laks og ørred gik tabt.

Selvom vi ved, at en del marine mikroalger kan slå fisk ihjel, så kendes de ansvarlige stoffer desværre ikke for hovedparten af disse alger. Dette gør det selvsagt svært at monitorere, fjerne og rådgive om disse stoffer i havbrug og dambrug. Netop denne

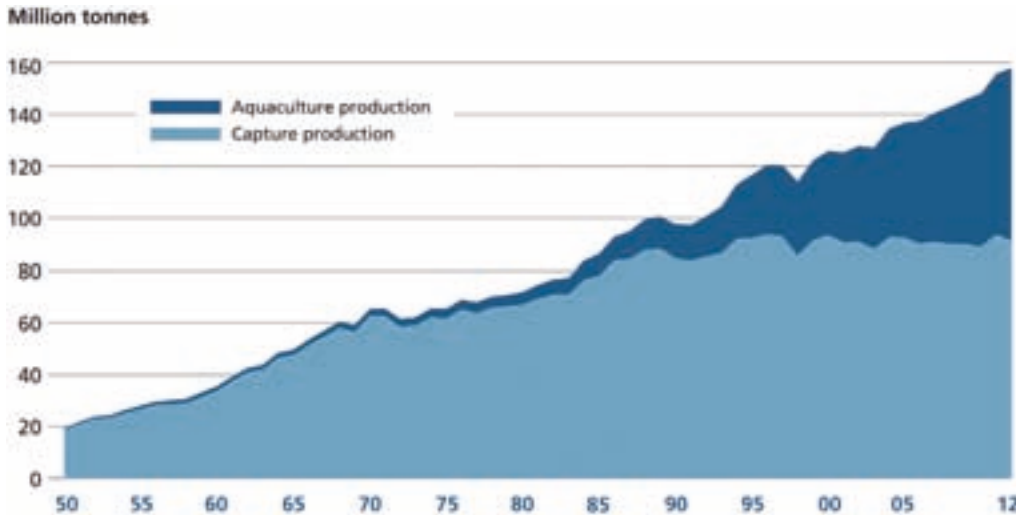
gruppe af toksiner har vi studeret i projektet Harmful Algae Blooms and FISHkills – HABFISH.

Ekstraktion af algekulturer - en udfordring

En af de store udfordringer ved at arbejde med marine mikroalger er det store volumen af algekultur, der er nødvendigt for at kunne isolere nye aktive metabolitter. Oftest skal der dyrkes >100 L, hvor både biomassen og supernatanten skal ekstraheres. Til dette formål sættes algekulturen på en kontinuert centrifuge, hvorpå biomassen og supernatanten kan opsamles separat. Vi har desuden observeret, at nogle af disse toksiner nedbrydes hurtigt, og dette stiller især krav til, hvor hurtigt det store volumen af supernatanten kan ekstraheres. Vi har derfor med fordel benyttet os af Solid-Phase Extraction (SPE)-kolonner, der loades online med centrifugatet.

Bio-assay

Til identifikationen af fiskegiftige stoffer havde vi brug for et hurtigt og simpelt bio-assay. Men hvordan tester man lige for fiskegiftighed i et *in-vitro*-assay? ▶



Figur 2. Den globale fiskeriproduktion har været stigende det sidste årti pga. af en øget dam- og havbrugsproduktion. Figuren er hentet fra FN's fødevarer- og landbrugsorganisation, FAO.org.

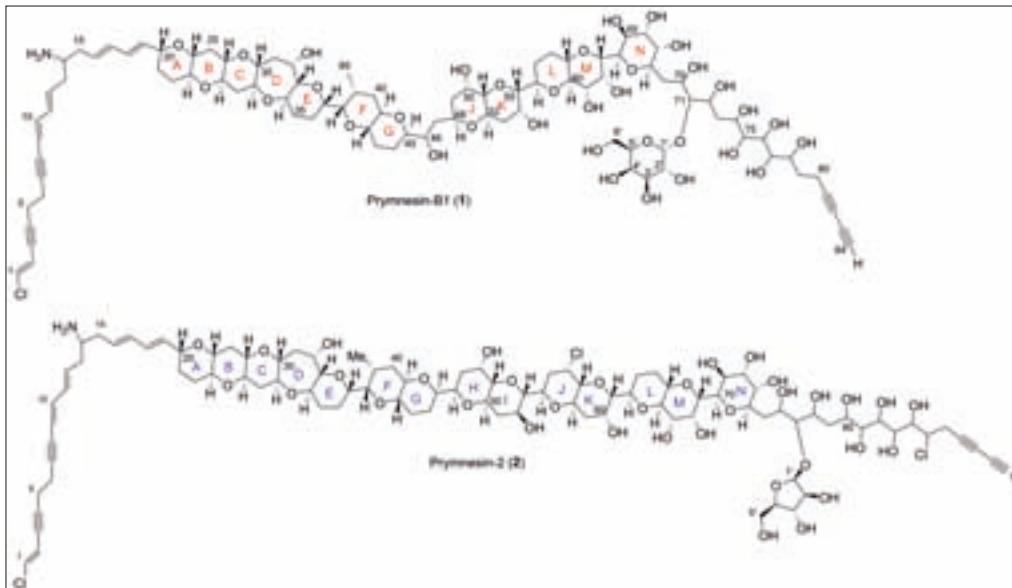
Do you need help with...

- ✓ PCR/qPCR
- ✓ NGS library prep
- ✓ Restriction enzymes
- ✓ Cloning
- ✓ Electrophoresis
- ✓ Antibodies
- ✓ Cell culture media
- ✓ Biochemicals
- ✓ Custom services

info@bionordika.dk
www.bionordika.dk
+45 3956 2000

NEW!

FREE
Student
Starter Box



Figur 3. Her ses strukturen af pymnesin-B1, som er oprenset fra en dansk stamme af *P. parvum*, sammen med strukturen af det originale pymnesin-2.



Figur 4. Stammer af *P. parvum* og deres oprindelse, der er blevet brugt i vores studie.

Fra forsøg med fisk havde vi observeret, at det typisk var fiskens gæller, der blev påvirket. Det var derfor nærliggende at benytte et regnbueørred fiskegællecelle-assay. På grund af dyreforsøgslovgivningen er det ganske omstændeligt at udføre forsøg på levende fisk. Dog har vi undervejs i projektet haft tilladelse til at udsætte fisk for giftige alger, således at vi har kunnet undersøge, hvorvidt vores *in-vitro*-fiskegælle assay nu også korrelerede med den observerede giftighed på fisk, når de udsættes for den samme mængde algegift.

Isolering af et 1815 Da stort fisketoksin

Vi har i dette projekt bl.a. arbejdet med den fiskegiftige alge *Prymnesium parvum*, en art der i disse år er skyld i udbredt fiskedød i især det sydlige USA.

I vores jagt på at finde de fiskegiftige stoffer fra en dansk *P. parvum*-stamme isolerede vi et meget *in-vitro* aktivt stof. Ved hjælp af højopløst massespektrometri (HRMS) kunne vi detektere en ion på hele 1815 Da, hvilket kunne omsættes til en

molekyleformel på $C_{91}H_{132}ClNO_{34}$.

For at kunne bestemme den kemiske struktur blev dette stof isoleret med henblik på analyse med NMR-spektroskopi. En af udfordringerne var at få nok stof fra algerne, da udbyttet var meget lille. Derfor blev der dyrket >100 L algekultur samt >40 L algekultur, som var beriget med ^{13}C -mærket natriumhydrogenkarbonat. Det sidste var nødvendigt for at kunne få signal på de mindre NMR-følsomme ^{13}C -isotoper. Det næsten fuldt ^{13}C -mærkede stof resulterede også i, at det blev muligt, at foretage mere avancerede 3D NMR-eksperimenter, som normalt kun benyttes indenfor proteinstrukturkemi.

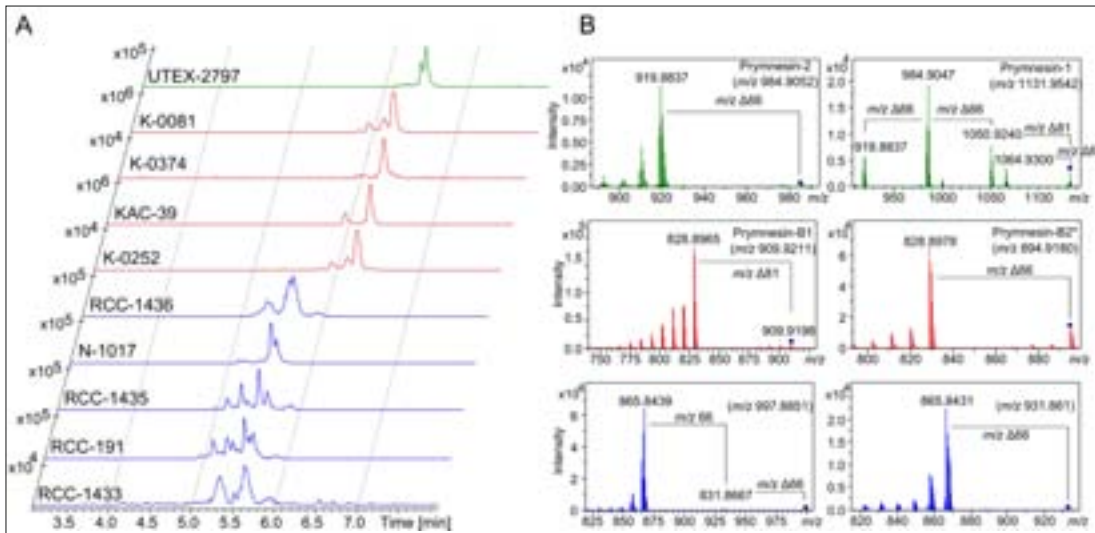
Det stod hurtigt klart, at stoffet var en polyether, hvilket rent NMR analytisk betød, at det ville være svært at se forskel på henholdsvis ether- eller alkoholbundne atomer. Dette løste vi ved at udnytte isotop-udskiftningseffekten, hvor en lille ændring i det kemiske skift kunne måles på alkoholbundne karbonatomer ved optagelse af NMR-data i henholdsvis CD_3OD og CD_3OH .

Den endelige struktur af vores nye stof viste sig at være analog til et andet kendt fiskegiftigt stof kaldet pymnesin-1, isoleret for 20 år siden. En mindre, men væsentlig strukturel forskel ligger i den centrale del af polyether-grundskelettet. På baggrund af dette definerer vores arbejde en ny B-type af pymnesiner. Test af pymnesin-B1 på regnbueørred viste at stoffet, tilsvarende til de oprindelige pymnesiner, er giftigt nede i de lave nM-koncentrationer.

Kemodiversitet af pymnesin-toksinerne

Med strukturoptaklingen af en ny B-type pymnesin var det nærliggende at se på udbredelsen af stoffer med dette nye grundskellet i mange stammer. Vi havde observeret, at når pymnesiner fragmenteres (MS/MS) i massespektrometret, så vi kun grundskellet uden sukker på (algyconen). Når vi derefter testede 10 stammer, som var indsamlet fra hele verden, kunne vi se, at det nye B-type grundskellet var udbredt i 4 stammer fra Skandinavien samt Australien. Til vores forbløffelse fandt vi, at kun én stamme, ud af de undersøgte 10 stammer, producerede pymnesiner med det originale grundskellet. Screening viste ligeledes, at de sidste 5 stammer hverken producerede originale eller nye B-typer af pymnesiner.

Vi gik derfor i gang med at lede efter flere lignende stoffer i vores prøver. Med hjælp fra HRMS- og MS/MS-eksperimenter lykkedes det at identificere, hvad der ligner en yderligere C-type, der især produceres af stammer fra Den engelske Kanal. I alt har vi detekteret 16 forskellige analoger indenfor de tre



Ved hjælp af højopløst massespektrometri (HRMS) blev der detekteret en ion med molekyleformlen $C_{91}H_{132}ClNO_{34}$. MS/MS-eksperimenter hjalp os med at detektere yderligere en C-type, med et kortere grundskelet.

typer prymnesiner, der varierer i deres indhold af klorinerings- samt glycosyleringsgrad, og vi forudsiger, at antallet af prymnesiner sandsynligvis er langt større i naturen.

Samlet set har vores resultater dokumenteret en meget større kemisk diversitet af disse typer af prymnesiner, end man hidtil har kendt til, og det forklarer, hvorfor ingen har været i stand til at detektere prymnesiner i forbindelse med algeopblomstringer

igennem de sidste 20 år. Vores arbejde baner derfor vejen for, at det fremover vil blive nemmere for analysekemikere at hjælpe fiskefarmere med at monitorere denne komplekse gruppe af toksiner.

E-mail:
Silas Anselm Rasmussen:
silan@bio.dtu.dk

Litteratur
Blossom, H.E., Rasmussen, S.A., Andersen, N.G., Larsen, T.O., Nielsen, K.F. & Hansen, P.J. (2014). *Prymnesium parvum* revisited: Relationship between allelopathy, ichthyotoxicity, and chemical profiles in 5 strains. *Aquatic Toxicology*, **157**, 159-166.

Rasmussen, S.A., Andersen, A., Andersen, N.G., Nielsen, K.F., Hansen, P.J. & Larsen, T.O. (2016). Chemical diversity, origin and analysis of phycotoxins. *Journal of Natural Products*, **79**, 662-673.
Rasmussen, S.A., Meier, S., Andersen, N.G., Blossom, H.E., Duus, J.Ø., Nielsen, K.F., Hansen, P.J. & Larsen, T.O. (2016). Chemodiversity of ladder-frame prymnesin poly-ethers in *Prymnesium parvum*. *Journal of Natural Products* (doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00345).



Hold dit kliniske laboratorium kørende 24/7

ELGA vandbehandlingsanlæg til klinisk laboratorium – dækker alles behov for rent vand

- Specielt udviklet til hospitaler med fuldautomatisk back up
- Dokumenteret overvågning af vandkvalitet
- Opfylder klinisk standardkrav (CLSI) for rent vand
- Sikker og stabil vandforsyning til klinisk laboratorium
- Højt serviceniveau med vagtordning

Kontakt vores vandspecialist for mere information
Mette Linding Nygaard, Sales Engineer - ELGA Labwater, KRÜGER AQUACARE
mob.: +45 26 28 31 41 / email: MLN@kruger.dk



Mød os på
LabMed stand 18