

大亚湾大鹏澳海域贝类和浮游植物中脂溶性毒素 及软骨藻酸研究

查道军^{1,2}, 李媛芳², 丁任业^{1,2}, 谢艺萱^{1,2}, 郑关超²,
谭志军², 李玉¹, 江涛³

(1.江苏海洋大学 海洋技术与测绘学院, 江苏 连云港 222000; 2.中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3.烟台大学 海洋学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 本文采用液相色谱—质谱联用法 (LC-MS/MS) 研究了 2017 年 4 个季节大亚湾大鹏澳水体浮游植物以及葡萄牙牡蛎 (*Crassostrea angulata*)、紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 和珍珠贝 (*Pteria margaritifera*) 3 种双壳贝类中脂溶性毒素的含量特征。结果显示, 水体浮游植物中存在具尾鳍藻 (*Dinophysis caudata*) 和拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia* spp.) 两种产毒藻; 浮游植物网采浓缩样品中检出了鳍藻毒素 (dinophysin toxin, DTX)、扇贝毒素 (pectenotoxin, PTX)、环亚胺毒素 (gymnodimine, GYM)、软骨藻酸 (domoic acid, DA) 4 种毒素。*D. caudata* 细胞丰度在春季最高 (420 cells/L), 在其他季节也有分布 (丰度低于 50 cells/L)。*Pseudo-nitzschia* spp. 细胞丰度最高值也出现在春季, 其次是夏季, 秋、冬季细胞丰度较低; 与此对应, 水体中 DA 也仅在春、夏季检出, 而秋、冬季未检出。在贝类样品中检出 4 种贝类毒素, 分别为大田软海绵酸 (okadaic acid, OA)、PTX、GYM 和 DA。其中 OA 和 PTX 在 3 种贝类样品贝肉组织中未被检测到, 但在消化腺中被检测到, 且主要出现在秋季; GYM 和 DA 在 3 种贝类样品的消化腺和贝肉组织中均被检测到, 且 DA 含量明显低于 GYM。OA、PTX 和 DA 在消化腺中的含量显著高于贝肉组织 (OA 和 PTX 未检出样品除外) ($P < 0.01$), 但 GYM 在消化腺和贝肉组织中的含量相差不大 ($P > 0.05$)。总体来讲, 本次调查中所有脂溶性毒素含量较低, 均在可食用的安全范围内。

关键词: 有毒藻; 脂溶性贝类毒素; 液相色谱—质谱联用; 具尾鳍藻; 拟菱形藻

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2022)05-0753-08

Study on lipophilic toxins and okadaic acid in shellfish and phytoplankton from Dapeng cove, Daya bay

ZHA Dao-jun^{1,2}, LI Ai-fang², DING Ren-ye^{1,2}, XIE Yi-xuan^{1,2},
ZHENG Guan-chao², TAN Zhi-jun², LI Yu¹, JIANG Tao³

(1.School of Marine and Geomatics, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222000, China; 2.Key Laboratory of Marine Fisheries Sustainable Development, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3.College of Ocean, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: In this study, we used LC-MS/MS to study the lipophilic toxins in phytoplankton and three bivalves (*Crassostrea angulata*, *Mytilus edulis*, *Pteria margaritifera*) in Dapeng cove of Daya bay in four seasons in 2017. The results showed that there were two kinds of toxigenic algae in the water, i.e., *Dinophysis caudata* and

收稿日期: 2021-08-04, 修订日期: 2022-01-13

基金项目: 国家科技基础资源调查专项(2018FYD100200); 国家自然科学基金项目(41676103)

作者简介: 查道军(1994—), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 主要研究方向为海洋空间信息技术, E-mail: 1535364565@qq.com

通讯作者: 江涛, E-mail: jiangtaojnu@163.com

Pseudo-nitzschia spp. DTX, PTX, GYM and DA were detected in the concentrated phytoplankton of net samples. The cell abundance of *D. caudata* was the highest in spring (420 cells/L), and also distributed in other seasons (less than 50 cells/L) The highest cell abundance of *Pseudo-nitzschia* spp. also appeared in spring, followed by summer, and the cell abundance was lower in autumn and winter. Correspondingly, DA was detected only in spring and summer, but not in autumn and winter. Four kinds of toxins, OA, PTX, GYM and DA were detected in shellfish samples. OA and PTX were not detected in the mussle of three shellfish samples, but they were detected in the digestive gland, which mainly appeared in autumn. GYM and DA were detected both in the digestive gland and muscle of all shellfish samples, but the DA concentration was significantly lower than that of GYM. The contents of OA, PTX and DA in digestive gland were significantly higher than those in mussle ($P < 0.01$), but GYM concentration showed no significant difference in digestive gland and muscle ($P > 0.05$). Generally speaking, the content of all lipophilic toxins measured in this survey is low and within the safe range of edible.

Key words: toxic algae; marine lipophilic toxins; LC-MS/MS; *Dinophysis caudata*; *Pseudo-nitzschia* spp.

海洋生物毒素(或称海洋藻毒素、贝类毒素)是海洋浮游植物产生的一类次生物质,可对海洋生态系统造成一定威胁。海洋生物毒素能沿着食物链传递并逐渐放大,进而导致人类食用海产品后发生中毒^[1]。此外,海洋生物毒素富集会大量导致鱼类和贝类死亡^[2]。海洋生物毒素包括水溶性毒素和脂溶性毒素(lipophilic toxins, LMTs)两大类,其中,脂溶性毒素种类较多、成分复杂。常见的脂溶性海洋生物毒素主要包括大田软海绵酸(okadaic acid, OA)及其衍生物鳍藻毒素(dinophysis toxin, DTX)、扇贝毒素(pectenotoxin, PTX)、环亚胺毒素(gymnodimine, GYM)、原多甲藻酸(azaspiric acids, AZAs)、虾夷扇贝毒素(homoyessotoxin, YTX)、螺环内酯毒素(spirolides, SPXs)等。另外,软骨藻酸(domoic acid, DA)是一种结晶性水溶性毒素^[3],能够引发失忆性贝类毒素(amnesic shellfish poisoning, ASP)中毒。虽然软骨藻酸的化学极性高于上述脂溶性毒素,但其提取方法与脂溶性毒素具有一定的相似性,故经常将两类毒素合并研究^[4]。

近几十年来,全球由脂溶性藻毒素引起的中毒事件常有报道。例如,2000年,希腊爆发严重的OA中毒事件,造成200人中毒,给贝类养殖业带来高达500万欧元的经济损失^[5];2010年,在意大利,300人食用OA污染过的贝类后中毒^[6-7]。在我国沿海贝类体内,腹泻性贝类毒素(OA和DTX)是脂溶性海洋生物毒素的主要组成部分。据统计,我国近岸海域贝类体内腹泻性贝毒检出率达

到41%^[8]。但总体来讲,脂溶性毒素中毒事件在我国并不多见。其中,规模较大的中毒事件发生在2011年5月浙江宁波市和福建宁德市,有200余人在食用了染毒贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)后出现腹泻、恶心、呕吐等症状^[9]。近几十年来,我国沿海贝类中LMTs的含量及产毒藻类的分布范围变广,出现频率有所增加,凸显了水产养殖海域毒素常规监测的重要性。

大亚湾是我国重要的水产养殖海域,近年来有关该海域脂溶性毒素的研究已有报道。然而有关大亚湾养殖的不同贝类种类及贝类不同组织间脂溶性毒素含量差异的研究却较少。大亚湾贝类养殖区主要养殖品种为牡蛎(*Crassostrea angulata*)、紫贻贝(*Mytilus edulis*)和珍珠贝(*Pteria margaritifera*),先前的研究表明,这3种贝类中的LMTs检出率很高(44%)^[3]。本研究主要调查大亚湾这3种双壳贝类中脂溶性贝类毒素的季节性变化及其与所摄食的产毒藻之间的关系,为研究毒素在不同贝类中的富集提供科学依据,也为我国水产养殖及食品安全监控提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 调查站位与时间

大亚湾位于中国大陆东南部,面积约650 km²,属亚热带气候。调查站位设置在大亚湾西南部的大鹏澳内,水深约5.5 m,大鹏澳为半封闭型溺谷湾,平均水深约7 m,该海域环境十分适合各类海产品的增养殖,被列为广东沿岸二类海水增

养殖区。本研究于2017年4月(春)、8月(夏)、10月(秋)、12月(冬)在大鹏澳开展季度调查,采样站点位于牡蛎养殖区内部(114°30'28" E, 22°33'50" N)。

1.2 采样方法

采用直径为30 cm的浮游植物网(筛绢孔径为20 μm)垂直拖网,采集上层3 m水体中的浮游植物(每次拖网的滤水体积为210 L),重复3次。每次拖网后富集的样品约为300 mL,将3次的样品混合并用过滤海水定容至1.0 L。将拖网浓缩水样分成4份,其中,3份300 mL样品用CF/F膜(Whatman, 0.7 μm)过滤,将滤膜储存在液氮中,用于毒素提取和分析;100 mL样品用鲁哥试剂固定保存,用于有毒藻细胞的鉴定和计数。

收集牡蛎、紫贻贝和珍珠贝3种贝类(贝龄超6个月),水体采样之前吊养于采样站点50 m范围内且时间超过30 d(水深约2 m水层)。贝类与水体样品的采集同步开展,每次采集不同种类贝类样品各25只,现场解剖后用过滤海水冲洗,并将消化腺与其他组织分离,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于毒素分析。

1.3 浮游植物的显微观察

将鲁哥试剂固定的水样避光静置48 h,虹吸浓缩至10 mL,将摇匀的样品用移液枪移取0.1 mL置于浮游植物计数框中,在显微镜下鉴定和计数,每个样品重复3次,记录数据,浮游植物种类鉴定参考《中国海洋生物名录》^[10]。

1.4 毒素样品制备

浮游植物样品中DA毒素的提取:将膜样品剪碎置于10 mL离心管中,加入10 mL 50%甲醇溶液,涡旋,超声,超声破碎仪破碎,将其离心后取上清液,待净化^[11],滤液于-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存待分析。

浮游植物样品中其他脂溶性毒素的提取:将膜样品剪碎置于15 mL离心管中,加入2 mL甲醇溶液,细胞破碎后离心,将上清液于氮吹仪器(E-EVAP-112)下氮吹至干,并用200 mL甲醇重新溶解后待分析^[12]。单个藻细胞毒素含量的计算方法:采用水体中某种毒素总量除以该毒素产毒藻的细胞总数,获得平均值。

贝类样品中脂溶性毒素的提取(DA除外):取(2 \pm 0.02) g贝肉组织或消化腺,加9 mL甲

醇,高转速涡旋3 min,离心后,用9.0 mL甲醇重复提取残余组织,并在匀浆器(Ultra Turrax, IKA, 德国)中匀浆1 min。将两种提取液的上清液与甲醇混合至20 mL。此外,为了定量分析贝类样品中OA和DTX的总含量,按Wu等^[13]的方法对提取液进行碱性水解。

贝类中DA毒素含量的测定参考《食品安全国家标准贝类中失忆性贝类毒素的测定》(GB5009.198—2016)^[14]。称取(5 \pm 0.01) g贝肉组织和消化腺样品放入离心管中,分别加入10 mL和5 mL 50%的甲醇溶液进行提取,提取液采用强阴离子固相萃取柱进行净化,样品分析在液相色谱—质谱联用仪(TSQ Endura)上进行。

1.5 液相色谱—串联质谱条件

1.5.1 液相色谱条件

色谱柱柱长100 mm,内径2.1 mm,粒径2.6 μm (Phenomenex C18),色谱柱温度35 $^{\circ}\text{C}$,样品室温度15 $^{\circ}\text{C}$,进样体积为10 μL 。流动相A为超纯水与2 mmol/L甲酸铵和100 μL 甲酸混合物,流动相B为甲醇。采用梯度洗脱,洗脱条件:0~1.0 min, 20% B; 1.1~3.0 min, 20%~90% B; 3.1~8.0 min, 20% B,流速为0.3 mL/min。

1.5.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源,扫描模式为正离子模式(ESI+),检测方式为多级反应监测(MRM),喷雾电压3500 V,离子传输管的温度为300 $^{\circ}\text{C}$,定量定性离子对 m/z 分别为312.1/266.1和312.1/248.1,驻留时间为100 ms。

1.6 数据统计分析

采用SPSS 23.0软件(美国SPSS公司)对不同实验组间数据差异进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果与讨论

2.1 产毒藻类的季节变化特点

浮游植物样品显微镜检结果显示,有毒藻为*Dinophysis caudata*和*Pseudo-nitzschia* spp.。*D. caudata*细胞丰度在春季最高(420 cells/L),在其他季节也均有分布(丰度低于50 cells/L),但丰度显著低于春季($P < 0.01$)(图1)。基于藻细胞总丰度和毒素总含量计算得出,*D. caudata*单细

胞毒素含量也存在季节差异,以秋季最高,其次为冬季,而春、夏季较低。*Pseudo-nitzschia* spp. 细胞最高丰度也出现在春季,其次是夏季;由于秋、冬季细胞丰度较低,DA未能检出,难以计算其单细胞DA毒素含量,而单细胞DA含量以春、夏季较高(图1)。大鹏澳贝类养殖海域的两种产毒藻分别是*D. caudata*和*Pseudo-nitzschia* spp.,是该海域产DSP和DA的相关藻种。2004年,香港周边的海域发现了倒卵形鳍藻(*Dinophysis fortii*)和渐尖鳍藻(*Dinophysis acuminata*)^[15]。鳍

藻产生的毒素种类很复杂,主要为OA、DTX1和DTX2,部分鳍藻还能够产生DTX3、DTX4、DTX5等更为复杂的毒素类型。拟菱形藻在海洋中是一类常见的浮游羽纹硅藻,是DA的重要生物来源。本次研究结果显示,高丰度*Pseudo-nitzschia* spp.集中在春、夏季,但先前的研究显示,夏、秋季更适宜*Pseudo-nitzschia* spp.生长^[15],这说明该藻在大亚湾海域的出现规律并不确定,可能受环境变化及人类活动的影响较大。

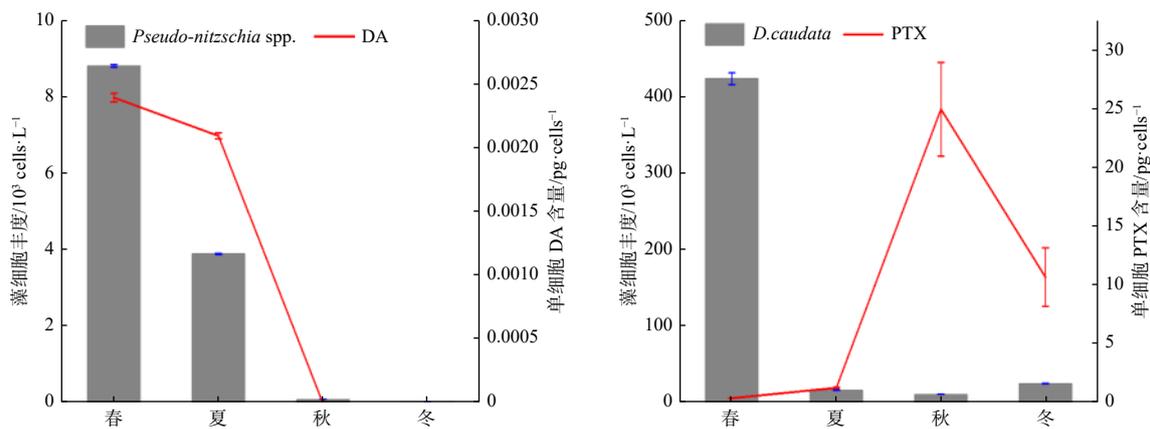


图1 网采浮游植物样品中有毒藻丰度和单细胞毒素含量的季节变化

Fig. 1 Seasonal variations of toxic algal abundance and single-cell toxin content in network-collected phytoplankton samples

2.2 藻类毒素组成及季节变化特点

浮游植物浓缩样品中检出4种脂溶性生物毒素,分别为DTX、PTX、GYM和DA,未检测出OA,其平均含量见表1。其中,PTX在4个季节均有检出,毒素含量春季最高(199.39 pg/L),

夏季最低(13.87 pg/L)。GYM和DTX只在3个季节检出,其中,GYM高浓度值出现在春季,而DTX高浓度值则出现在冬季。DA在样品中的含量及检出率均比较低,仅在春、夏季检出。

表1 大鹏澳浮游植物样品中海洋藻毒素含量和季节变化

Tab.1 The content and seasonal changes of marine lipophilic toxins in phytoplankton samples

| 时间 | GYM/pg·L $^{-1}$ | DTX/pg·L $^{-1}$ | PTX/pg·L $^{-1}$ | DA/pg·L $^{-1}$ |
|------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| 2017-04(春) | 33.92±0.67 | 1.09±0.02 | 199.39±4.65 | 12.17±0.15 |
| 2017-08(夏) | — | 6.22±0.08 | 13.87±0.27 | 6.28±0.14 |
| 2017-10(秋) | 9.91±0.17 | — | 195.47±5.8 | — |
| 2017-12(冬) | 20.38±0.56 | 14.58±0.22 | 143.34±3.65 | — |

注:“—”为未检出

先前的研究表明,即使在相同地理区域的同一物种,浮游植物中藻毒素的组成和含量也存在较大差异^[8]。本次研究结果表明,*D. caudata*单细

胞PTX毒素含量为0.451~31.7086 pg/cell,与Jiang等的测定结果(2.04~14.47 pg/cell)范围相近,但明显低于GaliciaRia海域的单细胞产毒量(最高

130 pg/cell)^[3]。本次调查中, *Pseudo-nitzschia* spp. 的藻细胞丰度变化范围为 $0.26 \times 10^3 \sim 8.8 \times 10^3$ cells/L, 藻细胞丰度为春季>夏季>秋季>冬季。拟菱形藻单细胞中 DA 毒素含量为 $0 \sim 0.0024$ pg/cell, 明显低于 Jiang 等的研究结果(单细胞藻 DA 含量为 $0.18 \sim 3.15$ pg/cell)^[16]。本研究没有对拟菱形藻种进行准确鉴定, 但相关研究在我国亚热带海域发现了 6 个具有潜在毒性的拟菱形藻类群^[16]。长期以来, 我国海域拟菱形藻中一直没有检出 DA, 直到 2013—2014 年, Jiang 等对大亚湾海域天然水体浮游植物进行富集并检出 DA 广泛存在^[15], 证实了我国海域浮游植物中存在能够产生 DA 的拟菱形藻。黄春秀等于 2016 年 9 月首次从大亚湾海域分离出一株能够产生 DA 的并基拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia decipiens*)^[17]。近几年, 我国沿海多处海域均检出了 DA 的存在, 表明有必要深入开展有毒拟菱形藻的种类鉴定和 DA 毒素分布的研究, 这对弄清我国海域 DA 污染现状及潜在毒素风险具有重要意义。

尽管贝类中 GYM 广泛分布, 但是我国沿海浮游植物样品中检出 GYM 的报道并不多^[16]。

本研究中浮游植物样品 GYM 含量在春季最高(33.92 pg/L), 仅夏季没有检出。 *Karenia selliformis* 和 *Alexandrium ostenfeldii* 被认为是能够产生 GYM 的藻类物种^[17], 然而本研究并没有发现这两种产毒藻, 原因可能是水体中的藻丰度较低且细胞外形特征不易鉴定。

2.3 贝类毒素的组成、含量及季节变换特点

2.3.1 贝类消化腺与贝肉组织中毒素含量的差异分析

OA 和 PTX 在 3 种贝类的贝肉组织中未检测到, 但存在于消化腺中, 且主要出现在秋季(表 2 和表 3)。珍珠贝消化腺的 OA 含量最高, 为 $149.04 \mu\text{g}/\text{kg}$, 是其他两种贝类消化腺中毒素含量的 3~5 倍; 在牡蛎和珍珠贝消化腺中检测到 PTX, 贻贝消化腺中则未检出 PTX。所有贝类样品的消化腺和贝肉组织中均检测到 GYM 和 DA, 但 DA 含量明显低于 GYM($P < 0.01$)。OA、PTX 和 DA 在消化腺中的含量显著高于贝肉组织(OA 和 PTX 未检出的样品除外)($P < 0.01$), 但 GYM 在消化腺和贝肉组织中的含量相差不大($P > 0.05$)(表 3 和表 4)。

表 2 3 种贝类肉组织中脂溶性贝类毒素

Tab.2 Lipophilic shellfish toxins in three kinds of shellfish tissues

| 时间 | OA/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | PTX/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | GYM/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | DA/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | |
|------------|--|-----|-----|---|-----|-----|---|---------------------------|-------------------------|--|------------------------|------------------------|
| | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 |
| 2017-04(春) | - | - | - | - | - | - | 118.64±9.34 ^a | 89.27±6.34 ^b | 72.05±9.67 ^c | 3.98±0.8 ^b | 4.88±0.25 ^b | 9.96±1.3 ^a |
| 2017-08(夏) | - | - | - | - | - | - | 70.01±9.8 ^b | 239.16±23.92 ^a | 64.83±5.97 ^b | 2.94±0.42 ^a | 2.64±0.33 ^a | 2.74±0.31 ^a |
| 2017-10(秋) | - | - | - | - | - | - | 67.75±6.92 ^b | 194.75±19.48 ^a | 64.38±6.51 ^b | 2.96±0.35 ^a | 2.14±0.21 ^b | 3.12±0.5 ^a |
| 2017-12(冬) | - | - | - | - | - | - | 102.85±14.4 ^a | 90.41±15.37 ^a | 82.17±7.4 ^a | 1.27±0.22 ^b | 1.32±0.11 ^b | 2.81±0.29 ^a |

注: “-” 为未检出

表 3 3 种贝类消化腺中脂溶性贝类毒素

Tab.3 Lipophilic shellfish toxins in digestive glands from 3 shellfish species

| 时间 | OA/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | PTX/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | GYM/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | | DA/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | | |
|------------|--|---------------------------|-------------------------|---|------------|-----|---|---------------------------|--------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 |
| 2017-04(春) | - | - | - | 58.89±5.31 | - | - | 128.95±10.32 ^a | 97.43±8.78 ^b | 88.24±8.81 ^b | 4.31±0.85 ^c | 7.54±0.68 ^b | 23.87±2.44 ^a |
| 2017-08(夏) | - | - | - | - | - | - | 71.88±4.35 ^b | 278.18±19.47 ^a | 66.31±7.29 ^b | 3.92±0.51 ^a | 3.94±0.32 ^a | 4.27±0.43 ^a |
| 2017-10(秋) | 28.95±2.94 ^b | 149.04±20.87 ^a | 49.19±4.92 ^b | 53.07±3.71 | 26.51±1.59 | - | 68.11±6.83 ^b | 261.7±26.17 ^a | 64.97±7.81 ^b | 4.22±0.47 ^b | 12.49±2.13 ^a | 5.82±0.7 ^b |
| 2017-12(冬) | - | - | - | - | - | - | 145.06±12.82 ^a | 110.38±10.06 ^b | 91.02±10.46 ^b | 2.87±0.26 ^b | 5.15±0.52 ^a | 4.76±0.39 ^a |

注: “-” 为未检出

表 4 3 种贝类消化腺与贝肉中毒素浓度比值

Tab.4 Ratio of toxin concentration in digestive gland and meat of three shellfish species

| 时间 | GYM/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | | DA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | |
|------------|---------------------------------------|------|------|--------------------------------------|------|------|
| | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 |
| 2017-04(春) | 1.09 | 1.09 | 1.22 | 1.08 | 1.55 | 2.40 |
| 2017-08(夏) | 1.03 | 1.16 | 1.02 | 1.33 | 1.49 | 1.56 |
| 2017-10(秋) | 1.01 | 1.34 | 1.01 | 1.43 | 5.84 | 1.87 |
| 2017-12(冬) | 1.41 | 1.22 | 1.11 | 2.26 | 3.90 | 1.69 |
| 平均值 | 1.13 | 1.20 | 1.09 | 1.53 | 3.19 | 1.88 |

注：“-”为未检出

2.3.2 3 种贝类样品中毒素含量的季节变化和种间差异

根据贝肉和消化腺质量的比例关系,对整个贝类组织的毒素含量进行加权平均(以下称为整贝)。贝类中 OA 和 PTX 主要出现在秋季,此期

间的鳍藻单细胞 PTX 毒素含量较高(图 1,表 5)。GYM 和 DA 全年均有出现,不同贝类间毒素含量存在季节差异。例如,珍珠贝中 GYM 含量全年以秋季最高,达 $90.75 \mu\text{g}/\text{kg}$;紫贻贝整贝的 DA 主要在春、冬季蓄积,其中春季最高,为 $11.78 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 5 3 种双壳贝类脂溶性贝类毒素加权平均值的季节变化

Tab.5 The weighted average seasonal variation of three kinds of bivalve mollusk lipophilic shellfish toxins

| 时间 | OA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | | PTX/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | | GYM/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | | DA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | | |
|------------|--------------------------------------|-------|-------|---------------------------------------|------|-----|---------------------------------------|-------|-------|--------------------------------------|------|-------|
| | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 | 牡蛎 | 珍珠贝 | 紫贻贝 |
| 2017-04(春) | - | - | - | 15.84 | - | - | 34.69 | 36.50 | 43.54 | 1.10 | 2.82 | 11.78 |
| 2017-08(夏) | - | - | - | - | - | - | 49.05 | 77.71 | 25.87 | 2.67 | 0.82 | 1.67 |
| 2017-10(秋) | 14.86 | 51.68 | 19.48 | 27.24 | 9.19 | - | 34.96 | 90.75 | 25.73 | 2.17 | 4.33 | 2.31 |
| 2017-12(冬) | - | - | - | - | - | - | 54.17 | 29.54 | 35.87 | 1.07 | 1.38 | 1.88 |
| 平均值 | | | | | | | 43.22 | 58.63 | 32.75 | 1.75 | 2.34 | 4.41 |

注：“-”为未检出

2.3.3 贝类对毒素的积累特征及食品安全风险评估

腹泻性贝类毒素(OA 及 DTX)是我国近岸海域贝类中风险较大的毒素种类。本研究结果显示,大鹏澳海域 3 种贝类的腹泻性贝类毒素含量较低,低于欧盟现行的控制标准^[11],不会造成人类急性中毒。先前的研究表明,大亚湾多种贝类中 OA 存在明显的季节分布特征,其中秋季的检出率相对较高,冬季较低,其余季节不明显,这与本研究结果相符。2005 年,徐志斌等对广东沿海进行的腹泻性贝毒调查发现, DSP 存在一定的季节变化差异,其中秋季含量最高^[18]。但是,同样处于亚热带气候特征的浙江南麂列岛海域,贝类中 DSP 秋季含量全年最低^[19],这说明

OA 类毒素在不同地区的季节分布规律不同,可能与产毒藻的生长周期有关。

本研究在 3 种贝类中均检测出 DA,而 Jiang 等 2013—2014 年在该海域牡蛎中并未检出 DA^[16]。这种差异可能与产毒藻的存在以及是否产毒等因素有关,也可能与 DA 毒素的提取方法有关。在 Jiang 等的研究中,所有生物毒素均采用 100% 甲醇溶液,而本研究改为 50% 甲醇溶液提取 DA 毒素,DA 的分子结构属于极性较强的一类毒素,其水溶性显著高于 OA 等其他脂溶性毒素^[16]。DA 可以导致人类出现呕吐、腹泻、腹部痉挛、头痛和头晕等症状,其中毒综合征主要为近期记忆丧失。在欧盟等国家,当贝类中 DA 的浓度超过 ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$) 时,禁止捕捞和销

售贝类^[20]。本研究中紫贻贝 DA 的含量在春季达到全年最高, 为 11.78 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但仍在安全阈值之内。

GYM 是发现较晚的毒素, 相对于其他几种贝类毒素而言, 被认为是低风险的毒素, 但其对高等动物尤其是人类的长期亚毒性效应尚不明确^[21]。GYM 在中国沿海地区污染率较高, 是贝类食品安全的潜在风险毒素。研究表明, GYM 在贝类体内的降解速率可长达数年, 说明该毒素在生态系统中的潜在风险是长期的^[21]。有关 GYM 在贝类不同组织中的分布研究尚不多见。本研究表明, 消化腺和贝肉组织中 GYM 毒素含量相差很小(表 4), 这可能与该毒素在贝类体内降解缓慢有关, 由于水体中毒素浓度较低, 消化腺和

贝肉组织中的毒素浓度达到了平衡状态。本研究所调查的 3 种贝类中的 GYM 毒素含量范围为 25.73 ~ 90.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (整贝), 远高于广西北海采集的缘齿牡蛎(*Dendostrea crenulifrea*, 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 而与广东湛江采集的 *Crassostrea ariakensis* 中的 GYM 含量(最高达 40.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$)相当^[22]。但本次研究中贝类的 GYM 含量明显低于突尼斯加贝斯湾海域的蛤蜊和新西兰沿海地区海域的牡蛎(表 6)。吴海燕等证实了 GYM 对哺乳动物的急性毒性作用, 但到目前为止还未确定其对人体的危害^[23]。因此, 由于大鹏澳 3 种贝类中 GYM 含量一直保持较高水平, 对人类健康可能具有一定的威胁, 应引起重视并对其进行长期监测。

表 6 国内外不同年份 GYM 含量对比

Tab.6 Comparison of GYM content in different years between China and other countries

| 年份 | 地区 | 贝类样品GYM/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 文献来源 |
|------|---------|---|------|
| 2001 | 突尼斯加贝斯湾 | 8263.5 | [20] |
| 2002 | 新西兰南岛海岸 | 1.71 | [22] |
| 2007 | 广西北海 | 12 | [24] |
| 2011 | 广东湛江 | 40.9 | [21] |
| 2012 | N新西兰 | 2136 | [25] |
| 2014 | 大亚湾 | 0.38 ~ 0.51 | [15] |
| 2016 | 中国沿海 | 0.85 ~ 211.47 | [26] |
| 2017 | 大亚湾 | 25.73 ~ 90.75 | 本研究 |

贝类对毒素的累积呈现一定的组织差异和种间差异。本研究结果显示, 3 种贝类的消化腺中的毒素含量均高于贝肉组织, 其中以 OA 及 PTX 类差异最大, 其次是 DA 毒素, 而 GYM 则差异最小(表 1、表 2、表 5)。贝类摄食有毒藻后的消化过程是导致贝类组织中毒素差异的主要原因。

贝类毒素积累的季节变化主要与有毒藻丰度及藻细胞的毒素含量有关。例如, *D. caudata* 丰度最高值出现在春季但单细胞毒素含量较低, 而单细胞毒素最高含量则出现在秋季, 这可能是导致贝类中 PTX 毒素在秋季较高的原因。贝类毒素和水体毒素含量并不总是表现出一致性(表 1、表 3)。贝类滤食、毒素累积及排出是一个较长的过程, 从而造成了贝体中毒素检出滞后

于有毒藻的检出, 这是水体中浮游植物与贝类毒素存在时间差异的主要原因。

3 结论

(1) 有毒藻是双壳贝类产生毒素的重要来源。大鹏澳海域的两种产毒藻分别是 *D. caudata* 和 *Pseudo-nitzschia* spp., 是该海域产 DSP 和 DA 的相关藻种。

(2) 大鹏澳贝类体内脂溶性毒素主要包括 OA、PTX、GYM 和 DA, 但是其毒素含量远小于安全阈值, 尚未引发食用者的急性毒性。

(3) 双壳贝类对脂溶性毒素具有不同的累积效果, 存在一定的季节性差异。贝类对毒素的累积呈现一定的组织差异和种间差异, 3 种贝类消化腺中的脂溶性毒素含量均高于贝肉组织。

(4) 贝类毒素累积的季节变化主要与有毒藻丰度及藻细胞的毒素含量有关, 但贝类毒素和水体毒素含量并不总是表现出一致性, 多种因素可能影响调查结果, 这体现出对毒素开展连续高密度监测的重要性。

参考文献:

- [1] 尹伊伟, 王朝晖, 江天久, 等. 海洋藻类毒素的生态毒理学研究[J]. *海洋环境科学*, 2004, 23(2): 78-80.
- [2] REGUERA B, VELO-SUÁREZ L, RAINE R, et al. Harmful *Dinophysis* species: a review[J]. *Harmful Algae*, 2012, 14: 87-106.
- [3] 李嘉雯, 江涛, 吴锋, 等. 珠江口与大亚湾海域腹泻性贝毒污染状况分析[J]. *暨南大学学报: 自然科学与医学版*, 2014, 35(3): 228-234.
- [4] JIANG T, CHEN F Y, YU Z H, et al. Size-dependent depletion and community disturbance of phytoplankton under intensive oyster mariculture based on HPLC pigment analysis in Daya Bay, South China Sea[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 219: 804-814.
- [5] KOUKARAS K, NIKOLAIDIS G. *Dinophysis* blooms in greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea)[J]. *Journal of Plankton Research*, 2004, 26(4): 445-457.
- [6] VISCIANO P, SCHIRONE M, BERTI M, et al. Marine biotoxins: occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1051.
- [7] REGUERA B, RIOBÓ P, RODRÍGUEZ F, et al. *Dinophysis* toxins: causative organisms, distribution and fate in shellfish[J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(1): 394-461.
- [8] 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等. 中国近海藻毒素及有毒微藻产毒原因种调查研究进展[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(3): 511-524.
- [9] LI A F, MA J G, CAO J J, et al. Toxins in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) associated with diarrhetic shellfish poisoning episodes in China[J]. *Toxicon*, 2012, 60(3): 420-425.
- [10] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 50-122.
- [11] 黄春秀, 徐国双, 李扬. 大亚湾水域并基拟菱形藻的种类鉴定和产毒特征分析[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(5): 1118-1125.
- [12] 王艳龙. 近海沉积物、悬浮颗粒物中脂溶性藻毒素检测及藻体中毒素的纯化[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2016: 25-26.
- [13] WU H Y, GUO M M, TAN Z J, et al. Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for multiclass screening and identification of lipophilic marine biotoxins in bivalve mollusks[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1358: 172-180.
- [14] 郑关超, 吴海燕, 彭吉星, 等. 典型贝类对一株拟菱形藻所产多莫酸毒素的蓄积差异性研究[J]. *中国渔业质量与标准*, 2020, 10(1): 29-35.
- [15] JIANG T, LIU L, LI Y, et al. Occurrence of marine algal toxins in oyster and phytoplankton samples in Daya Bay, South China Sea[J]. *Chemosphere*, 2017, 183: 80-88.
- [16] LÜ S H, LI Y, LUNDHOLM N, et al. Diversity, taxonomy and biogeographical distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Guangdong coastal waters, South China Sea[J]. *Nova Hedwigia*, 2012, 95(1/2): 123-152.
- [17] SALGADO P, RIOBÓ P, RODRÍGUEZ F, et al. Differences in the toxin profiles of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) strains isolated from different geographic origins: evidence of paralytic toxin, spirolide, and gymnodimine[J]. *Toxicon*, 2015, 103: 85-98.
- [18] 徐志斌, 吴施卫, 陈凯彪, 等. 广东省近岸海域贝类腹泻性毒素含量与胃含物的分析[J]. *海洋通报*, 2010, 29(4): 444-449.
- [19] 张树刚, 邹清, 陈雷, 等. 浙南海域腹泻性贝毒分析[J]. *海洋科学*, 2011, 35(1): 44-47.
- [20] MACKENZIE L, HOLLAND P, MCNABB P, et al. Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis[J]. *Toxicon*, 2002, 40(9): 1321-1330.
- [21] STIRLING D J. Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine[J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2001, 35(4): 851-857.
- [22] LIU R Y, LIANG Y B, WU X L, et al. First report on the detection of pectenotoxin groups in Chinese shellfish by LC-MS/MS[J]. *Toxicon*, 2011, 57(7/8): 1000-1007.
- [23] 吴海燕, 郭萌萌, 谭志军, 等. 环亚胺毒素研究进展[J]. *中国渔业质量与标准*, 2012 (03): 23-34.
- [24] 刘仁沿, 梁玉波. 环亚胺毒素gymnodimine的研究进展[J]. *应用生态学报*, 2009, 20(9): 2308-2313.
- [25] NAILA I B, HAMZA A, GDOURA R, et al. Prevalence and persistence of gymnodimines in clams from the Gulf of Gabes (Tunisia) studied by mouse bioassay and LC-MS/MS[J]. *Harmful Algae*, 2012, 18: 56-64.
- [26] 李美慧, 李爱峰, 曹际娟, 等. 我国常见的几种脂溶性贝毒的研究进展[J]. *生命科学*, 2016, 28(1): 33-43.