

改性粘土对虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*) 体内麻痹性贝毒的影响*

孟晓君^{1, 2, 3, 4} 宋秀贤^{1, 2, 3, 4} 张悦^{1, 2} 宋维佳^{1, 2, 3, 4}
张培培^{1, 2, 3, 4} 申慧慧^{1, 2, 3, 4} 俞志明^{1, 2, 3, 4}

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室 山东青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室 山东青岛 266237; 3. 中国科学院大学 北京 100049; 4. 中国科学院海洋大科学研究中心 山东青岛 266071)

摘要 目前, 改性粘土技术已成为国内外普遍认可的有害赤潮治理方法, 但在利用该技术治理产毒藻赤潮过程中, 对底栖滤食性贝类体内毒素累积和排出的影响尚不清楚。通过室内实验, 考察了聚合氯化铝改性粘土(MC I)絮凝典型产毒藻——太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)后, 虾夷扇贝食用组织和消化腺组织中麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)含量、组分的变化情况。研究表明, 在前期毒素累积阶段, 虾夷扇贝暴露于 *A. pacificum* 3 h 后, 未添加改性粘土的对照组中虾夷扇贝食用组织毒素水平由空白组的未检出迅速升高至 13.24 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 消化腺组织毒素水平由 0.68 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 升高至 42.97 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 第 4 d 时对照组食用组织、消化腺组织毒素水平达到最高, 分别为 258.67 和 3 208.40 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 。添加 0.2 g/L MC I 的实验组中, 3 h 后水体中 97% 的 *A. pacificum* 藻细胞被絮凝沉降, 此时虾夷扇贝食用组织和消化腺组织毒素水平远低于对照组, 分别为 6.33 和 18.39 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 第 2 d 时达到 98.92 和 574.54 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 随后呈下降趋势。在随后的毒素排出阶段, 实验组虾夷扇贝食用组织和消化腺组织毒素水平显著低于对照组 ($P < 0.05$)。另外, 在累积阶段, 对照组和实验组虾夷扇贝食用组织和消化腺组织中 PSP 各组分相对含量差异不大, 说明改性粘土未对虾夷扇贝体内的 PSP 转化造成明显影响。由实验结果可见, 改性粘土可有效絮凝去除水体中的 *A. pacificum* 藻细胞, 减少虾夷扇贝对其的滤食, 从而降低了 PSP 在贝类体内的积累, 该研究结果将为改性粘土治理底栖贝类养殖水体有毒赤潮提供科学依据。

关键词 改性粘土; 太平洋亚历山大藻; 虾夷扇贝; 麻痹性贝毒

中图分类号 X55 **doi:** 10.11693/hyhz20211100267

赤潮是一种全球性的海洋生态灾害, 近年来, 在世界各沿海国家频繁暴发, 严重制约海洋经济发展、威胁人类食品安全, 特别是有毒甲藻赤潮在世界范围内呈逐年增加的态势(Anderson *et al.*, 2012; 唐赢中等, 2016)。其中, 亚历山大藻(*Alexandrium*)是一种能够产

生麻痹性贝毒(paralytic shellfish poisoning, PSP)的典型甲藻, 广泛分布于我国沿海。2002~2017 年间, 该藻在我国近海形成了 24 次赤潮(梁玉波等, 2019)。2016 上半年智利近海暴发的链状亚历山大藻(*Alexandrium cantenella*)和 *Pseudochattonella verruculosa* 赤潮, 造

* 国家自然科学基金项目, 41976148 号; 山东省重大科技创新工程, 2019JZZY010808 号; 2019 年度“泰山学者攀登计划”。
孟晓君, 硕士研究生, E-mail: 2311250636@qq.com

通信作者: 宋秀贤, 博士生导师, 研究员, E-mail: songxx@qdio.ac.cn

收稿日期: 2021-11-05, 收修改稿日期: 2021-12-24

成智利的三文鱼年产量损失了 12% (Mascareño *et al.*, 2018)。频繁暴发的亚历山大藻赤潮不仅给养殖业带来巨大损失, 还会对人的生命造成威胁。当亚历山大藻赤潮暴发时, 贝类滤食藻细胞后可通过食物链将 PSP 转移到人体, 严重时可导致人类中毒死亡(Bricelj *et al.*, 1998)。据统计, 全球范围内每年约发生 2 000 起 PSP 中毒事件, 人员死亡率高达 15% (Anderson *et al.*, 2012)。因此, 寻求一种高效、安全的有毒赤潮防控方法尤为重要。

改性粘土治理赤潮主要是依靠粘土颗粒和赤潮生物间的有效碰撞与结合, 形成粘土-细胞絮凝体沉降水体底部, 从而实现对水体中赤潮生物的有效去除。该方法具有操作简便、成本低、环境友好等优点, 是一种安全、高效的赤潮应急处置技术(俞志明等, 2019)。改性粘土对多种赤潮生物具有理想的去除效果, 0.2 g/L MC I 对密度为 1×10^4 cells/mL 的太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*) 3 h 去除率可达 75% (Zhang *et al.*, 2018)。Liu 等(2017)和 Zhu 等(2018)研究发现, 改性粘土还会对残留赤潮藻细胞产生胁迫作用, 抑制赤潮再次暴发。另外, 以往研究表明, 适宜浓度的改性粘土在高效去除赤潮生物的同时, 对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)等多种生物无不良影响(高咏卉等, 2007; 王志富等, 2014; 王梓瞳等, 2019; 张培培等, 2019)。

不同贝类对 PSP 的累积和排出速率不同, 存在明显的种间差异, 通常相较于牡蛎和蛤类, 扇贝对 PSP 的累积毒性高, 排出慢(邱江兵, 2014)。因此, 扇贝更易受到亚历山大藻的影响, 造成 PSP 在其体内的累积。其中虾夷扇贝隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、珍珠贝目(Pteriodia)、扇贝科(Pectinidae), 是我国北方重要的养殖贝类。虾夷扇贝在辽宁沿海的养殖面积达 70 余万公顷, 年产量超 20 万吨, 产值达 50 亿元(全国水产技术推广总站, 2018)。近年来虾夷扇贝体内 PSP 的检出率较高, 时文博等(2020)在抽查天津市市场销售的 9 种经济贝类中 PSP 含量时发现, 虾夷扇贝的检出率最高, 达 66.7%。改性粘土可高效防控亚历山大藻赤潮, 但对虾夷扇贝体内 PSP 的影响尚不清楚。本研究以虾夷扇贝为受试生物, 考察了改性粘土絮凝亚历山大藻后贝类体内 PSP 含量、组分的变化, 初步分析了带来这些影响的原因, 以期在现场应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

改性粘土材料由广西北海的高岭土经聚合氯化铝(poly aluminum chloride, PAC)改性处理配制而成, 本文称之为 MC I, 制备方法详见文献(俞志明等, 1994)。配制 MC I 母液浓度为 40 g/L。

虾夷扇贝取自山东威海荣成寻山集团, 扇贝规格为壳长(48.0±7.10) mm、壳高(47.55±5.55) mm, 实验前驯化 7 d。海水取自青岛汇泉湾近海, 驯化条件为 pH 值 7.8~8.2, 温度 14~18 °C, 均匀充气, 使溶解氧保持 >5 mg/L, 自然光照培养。每日投喂适量小新月菱形藻(*Nitzschia closterim f. minutissima*)。

太平洋亚历山大藻(*A. pacificum*)取自中科院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室。培养海水经 0.45 μm 滤膜过滤后, 121 °C 高温灭菌 30 min, 在光照 65 μmol photon/(m²·s), 光暗比为 L : D=12 h : 12 h, 温度 19~21 °C 下, 采用 L1 培养液培养。选择指数生长期的藻进行实验, 藻密度约为 7×10^3 cells/mL。

1.2 实验方法

1.2.1 PSP 在虾夷扇贝体内的累积 实验使用体积为 65 L (660×440×343 mm)的水箱, 各水箱放入 45 只虾夷扇贝, 共设 A、B、C 三组, 每组设置 3 个平行。A 组为空白组, 添加 50 L 海水; B 组为对照组, 添加 50 L 稀释后密度为 2×10^3 cells/mL 的 *A. pacificum* 藻液; C 组为实验组, 添加 50 L 稀释后密度为 2×10^3 cells/mL 的 *A. pacificum* 藻液后, 喷洒 MC I 母液使其终浓度为 0.2 g/L。累积阶段为 4 d, 期间不换水, 不投饵。A 组在 0、2、4 d 时取样, B、C 组在 3 h、12 h、1 d、2 d、4 d 时取样, 进行虾夷扇贝体内 PSP 含量、组分, 以及水体中藻密度的测定。其他培养条件同驯化条件。

1.2.2 PSP 在虾夷扇贝体内的排出 4 d 后, 将 B、C 两组中扇贝取出, 依次放入 6 个盛有 5 L 海水的烧杯中, 排出阶段为 6 d, 每日换水、投喂适量小新月菱形藻。B、C 组分别在 6 d 时取样, 进行虾夷扇贝体内 PSP 含量、组分的检测。其他培养条件同驯化条件。

1.2.3 MCI 对虾夷扇贝滤水率的影响 在 20 L (440×298×243 mm)的水箱中各放入虾夷扇贝 35 只, 一次性喷洒适量 MC I 母液, 使各组 MC I 浓度分别为 0、0.05、0.26、0.52 g/L, 每组设置三个平行。喷洒后的第 2 d 开始隔天换水一次, 不吸底, 换水量 2/3, 第 2 d 换水后每日投喂适量小新月菱形藻。在 9 d 时从各水箱随机取 3 只虾夷扇贝, 放置在密度为

1×10^5 cells/mL 的小新月菱形藻藻液中,同时设置无生物的自然沉降组 1 个,扣除由藻细胞自然沉降和生长带来的误差,2 h 后测定各组藻密度。滤水率的计算公式参见(Coughlan, 1969)。

1.3 实验参数的测定

1.3.1 藻细胞密度的测定 将藻液混匀后取至离心管中,加入鲁哥氏液将其固定后,用 100 μ L 浮游植物计数框在显微镜(NIKON ECLIPSE50i)下计数。

1.3.2 PSP 的提取 样品前处理参考吴海燕等(2017),从各组水箱中分别取出 4 只虾夷扇贝分离其消化腺组织和食用组织(除消化腺外的全部组织),在底部平铺吸水纸的 50 目筛子上平铺沥水约 10 min,分别置于组织匀浆机中匀浆。称取 5 g 食用组织匀浆于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 1%乙酸水溶液,涡旋混合 90 s,将离心管密封置于沸水中煮沸 5 min,取出置于流水下冷却至室温,4 500 r/min 离心 10 min,量取提取液体积。称取全部消化腺组织匀浆置于 15 mL 离心管中,加入与其重量相同体积的 1%乙酸水溶液后重复上述提取步骤。

分别移取上述食用和消化腺组织提取液 1 mL 于 2 mL 离心管中,加入 5 μ L 氨水,涡旋混匀。依次用 2 mL 乙腈、2 mL 20%乙腈水溶液(含 1%乙酸)、2 mL 0.1%氨水溶液活化 Supelco ENVI-Carb (250 mg/3 mL) 固相萃取柱,加入 500 μ L 提取液,再用 700 μ L 超纯水淋洗,负压挤干,最后用 1 mL 75%乙腈水(含

0.25%甲酸)洗脱混匀,过 0.22 μ m 滤膜于进样小瓶中, -20°C 下保存,供液相色谱-串联质谱分析。

1.3.3 PSP 的检测 PSP 通过高效液相色谱串联质谱法测定,所用仪器为 1290 Infinity II 型高效液相色谱仪和 G6546 Q-TOF/MS(美国 Agilent 公司)。

色谱条件:采用 ZIC-HILIC 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 3.5 μ m)对 PSP 毒素进行分离。使用二元流动相,梯度洗脱。流动相 A:水(含 2 mmol/L 乙酸铵, 0.03%甲酸),流动相 B:90%乙腈水溶液(含 2 mmol/L 乙酸铵, 0.03%甲酸);梯度洗脱程序:0~5 min, 100%~30% B; 5~20 min, 30% B。停止时间:20 min;平衡时间:8 min;流速:0.2 mL/min;进样体积为 10 μ L;柱温:(30 \pm 1) $^\circ\text{C}$ 。

质谱条件:在全扫描负离子模式下对 PSP 毒素进行高分辨质谱检测。采用 AJS-ESI 离子源;干燥气温度:300 $^\circ\text{C}$;干燥气流速:8 L/min;雾化器压力:20 psi;鞘气温度:320 $^\circ\text{C}$;鞘气流速:11 L/min;毛细管电压:3 500 V;扫描范围 100~600 m/z 。

1.4 数据处理

利用 SPSS 22.0 软件,对数据进行单因素方差分析(ANOVA),比较实验组与对照组间是否存在显著差异(差异显著性水平 $\alpha=0.05$),运用 Origin 2019 和 Excel 2016 对数据进行处理和绘图。PSP 不同组分毒性的归一化处理:将组分 STX 的毒性设为 1,其他组分按照毒性因子(表 1),统一转换为 STX 来表示,计算方式参见(Turner *et al.*, 2015)。

表 1 麻痹性贝毒(PSP)毒性因子(Oshima, 1995)

Tab.1 The toxicity factor of PSP (Oshima, 1995)

PSP	C1	C2	GTX4	GTX1	dcGTX3	GTX5	dcGTX2	GTX3	GTX2	neoSTX	dcSTX	STX
毒性因子	0.006	0.096	0.730	0.990	0.750	0.060	0.650	0.640	0.360	0.920	0.510	1.000

2 结果与分析

2.1 改性粘土对 *A. pacificum* 的去除效果

为了明确改性粘土自身是否会对虾夷扇贝的滤食行为产生影响,首先考察了不同浓度 MC I 处理下扇贝滤水率的变化情况。实验结果显示,添加 MC I 的实验组中扇贝滤水率与对照组无显著差异($P>0.05$),说明该实验中所选用的 MC I 用量下不会影响扇贝的滤食情况,选择 0.2 g/L MC I 进行后续实验。

对于未添加 MC I 的 B 组,在虾夷扇贝的滤食作用下,藻密度呈平缓下降的趋势,3 h 时藻密度由 2 000 cells/mL 降低至 1 593 cells/mL,在 4 d 时藻密度降低至 23 cells/mL。添加了 0.2 g/L MC I 的 C 组,由

于 MC I 对藻细胞的快速絮凝沉降,藻密度在 3 h 内由 2 000 cells/mL 迅速降低至 67 cells/mL,在此后的各时间点均低于 100 cells/mL,在 4 d 时降低至 17 cells/mL(图 1)。在实验过程中, B 组藻密度均高于 C 组。

2.2 贝类组织中的毒素变化情况

2.2.1 PSP 毒素含量 首先需要确定实验所用虾夷扇贝是否被 PSP 毒素污染。分析结果显示,空白组虾夷扇贝(A 组)的食用组织在 0、2、4 d 三个取样点均未检测到 PSP,但在其消化腺组织中检测到少量 PSP,均为 0.025 μ mol/kg,说明实验所用扇贝在原来的生长环境中被产毒藻轻微污染,但含量较低,对后续的实验结果不会产生干扰。

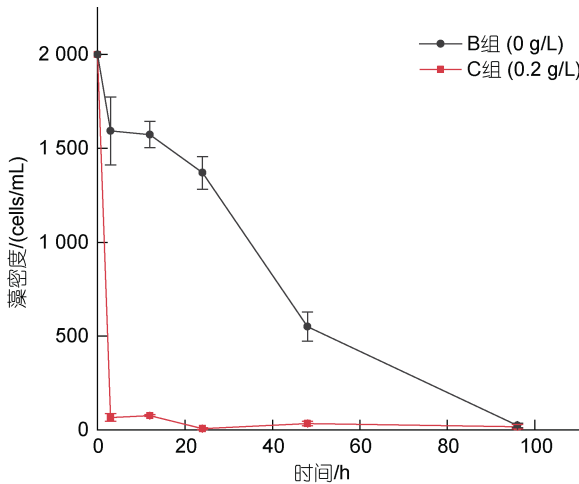
图1 不同实验组中 *A. pacificum* 密度的变化

Fig.1 Changes in algal density of *A. pacificum* in each experimental group

B组和C组扇贝食用和消化腺组织中PSP含量的变化如图2所示。在前4d累积阶段, B组扇贝食用组织中PSP含量不断上升, 由实验前的未检测到2d时

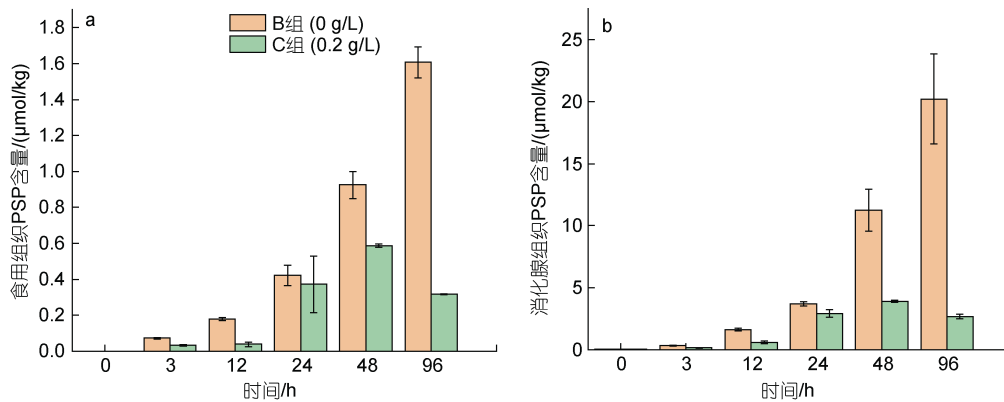


图2 累积阶段虾夷扇贝不同组织中PSP含量变化

Fig.2 Changes in PSP concentration in different tissues of *Mizuhopecten yessoensis* in accumulation stage
注: a: 食用组织; b: 消化腺组织

表2 排出阶段虾夷扇贝不同组织中PSP含量(单位: $\mu\text{mol/kg}$)

Tab.2 PSP concentration in different tissues of *Mizuhopecten yessoensis* in depuration stage (unit: $\mu\text{mol/kg}$)

排出时间/d	食用组织 PSP		消化腺组织 PSP	
	B组	C组	B组	C组
0	1.61	0.32	20.20	2.69
6	0.60	0.09	9.15	1.61

2.2.2 PSP毒素组分 如图3所示, *A. pacificum* 藻细胞中PSP组分主要包括C1、C2、GTX1、GTX2、GTX3、GTX4、GTX5、dcGTX2、dcGTX3。当虾夷扇贝滤食了 *A. pacificum* 藻细胞后, 其体内PSP组分

升高至 $0.92 \mu\text{mol/kg}$, 在4d时达到最高 $1.61 \mu\text{mol/kg}$; C组呈现先升高后降低的趋势, 在2d时就达到最高 $0.59 \mu\text{mol/kg}$, 随后呈下降趋势。在累积阶段B组扇贝食用组织中PSP含量始终高于C组(图2a)。同样, B组扇贝消化腺组织中PSP含量, 由实验前的 $0.025 \mu\text{mol/kg}$ 逐渐升高, 在4d时达到最高 $20.2 \mu\text{mol/kg}$; C组虽然也有所增加, 2d后达 $3.91 \mu\text{mol/kg}$, 到4d时又降至 $2.69 \mu\text{mol/kg}$ 。总体而言, 添加了改性粘土的C组扇贝消化腺组织中PSP含量在不同的采样时间点均低于B组(图2b)。

经过在海水和新月菱形藻共培养体系中6d的排出阶段后, 扇贝各组织中PSP含量均明显降低。其中, 在食用组织中, B组和C组PSP含量分别由 1.61 和 $0.32 \mu\text{mol/kg}$ 降低至 0.6 和 $0.09 \mu\text{mol/kg}$ 。在消化腺组织中, B组和C组PSP含量分别由 20.2 和 $2.69 \mu\text{mol/kg}$ 降低至 9.15 和 $1.61 \mu\text{mol/kg}$ (表2)。不论是食用组织还是消化腺组织, B组PSP含量均显著高于C组($P < 0.05$)。

与藻细胞相比存在明显差异。滤食3h后, 原本在藻细胞中存在的GTX2、GTX3、GTX4、dcGTX2、dcGTX3在扇贝食用和消化腺组织中均未检出。此外, 两种扇贝组织中C1:C2比率与藻细胞相比有明显降低, 在食用组织中, B、C组C1:C2比率由藻细胞中的2.8分别降低至0.7和0.5; 在消化腺组织中, 两组比率均降低至0.6。另外, 在3h时, 扇贝各组织中未检出GTX4, 而对于GTX4的差向异构体GTX1, 在食用组织中, B、C组扇贝GTX1占比分别由藻细胞中的22%升高至41%和42%, 在消化腺组织中, GTX1占比分别为26%和24%。在前4d的累积阶段, B、C组扇贝食用和消化腺组织中PSP主要组分均为C1、C2、

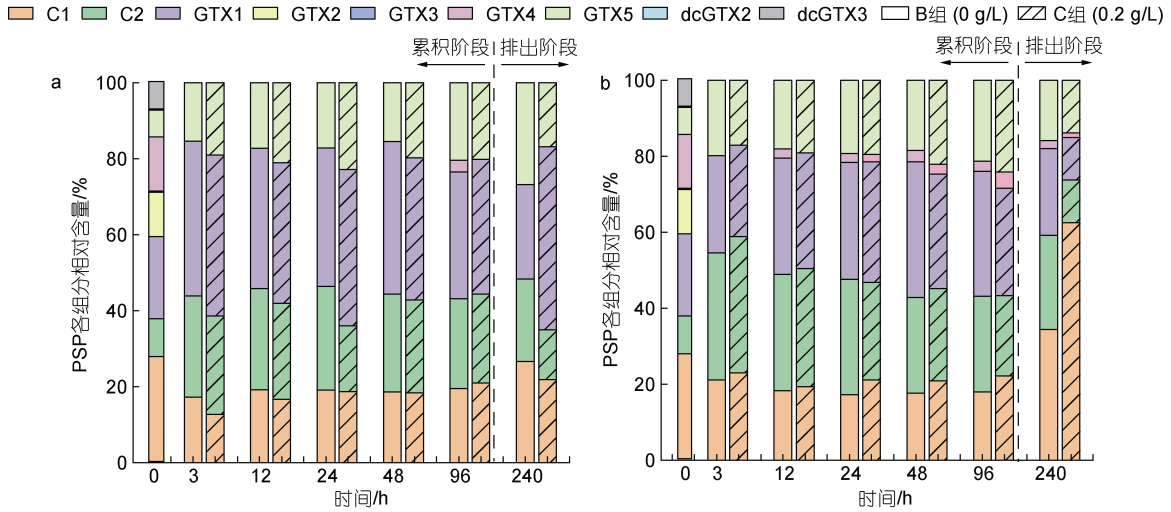


图 3 藻细胞内及虾夷扇贝不同组织中 PSP 组成

Fig.3 PSP composition in algae and different tissues of *Mizuhopecten yessoensis*
注: a: 食用组织; b: 消化腺组织; a、b 图中 0 h 代表 *A. pacificum* 藻细胞中 PSP 组成

GTX1、GTX5, 组分占比在不同取样时间点均较稳定, 且两组间差异不大。

经过 6 d 的排出实验后, 扇贝食用和消化腺组织中 PSP 主要组成仍为 C1、C2、GTX1、GTX5, 但有些组分占比发生了明显的变化。其中, 在食用组织中, C 组 GTX1 占比明显升高, 由 35% 升高至 48%; 在消化腺组织中, B、C 组 C1 占比均有不同程度的提升, B 组中 C1 占比由 18% 提高到 34%, C 组中 C1 占比由 22% 提升到 62%。

2.2.3 PSP 毒素水平 PSP 由多种组分组成, 不同组分的毒性有很大差异(表 1)。在贝类体内可能存在含量高的组分毒性低, 含量低的组分毒性高的情况。为更清楚地了解改性粘土絮凝藻细胞过程中对扇贝不同组织中 PSP 总毒性的影响, 本研究将 PSP 不同组分的毒性进行归一化处理, 统一用 STXeq 来表示。虾

夷扇贝食用和消化腺组织中 PSP 毒素水平的变化如图 4、表 3 所示。

在前 4 d 累积阶段, B 组食用组织的 PSP 毒素水平不断上升, 由实验前的未检出提升至 4 d 时的 258.67 $\mu\text{g STXeq/kg}$; 利用改性粘土絮凝去除 *A. pacificum* 的 C 组中, 食用组织的 PSP 毒素水平先上升, 在 2 d 时达到最高值 98.92 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 随后呈下降趋势。在累积阶段 B 组扇贝食用组织中 PSP 毒素水平始终高于 C 组(图 4a)。同样, B 组扇贝消化腺组织中的 PSP 毒素水平, 由实验前的 0.68 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 逐渐升高至 4 d 时的 3 208.4 $\mu\text{g STXeq/kg}$; C 组则呈现先升高后降低的趋势, 2 d 后升高至 574.54 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 到 4 d 时又降至 384.99 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 。总体而言, C 组扇贝消化腺组织中 PSP 毒素水平在不同时间点均低于 B 组(图 4b)。

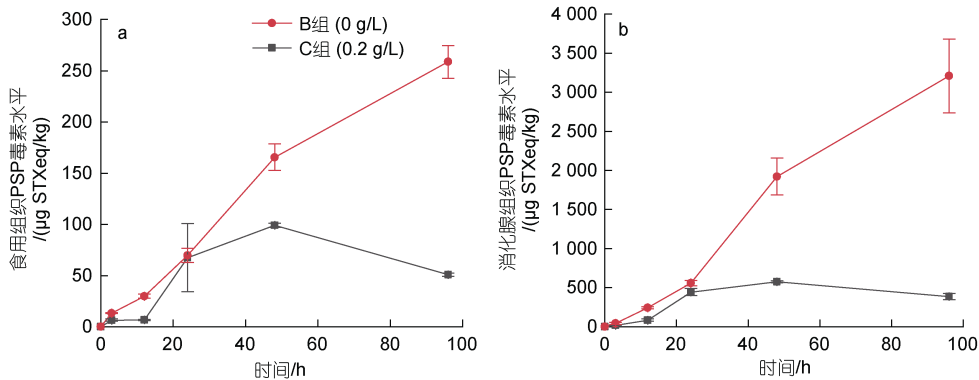


图 4 累积阶段虾夷扇贝不同组织中 PSP 毒素水平变化

Fig.4 Changes in PSP toxicity level in different tissues of *Mizuhopecten yessoensis* in accumulation stage
注: a: 食用组织; b: 消化腺组织

表 3 排出阶段虾夷扇贝不同组织中 PSP 毒素水平(单位: $\mu\text{g STXeq/kg}$)

Tab.3 PSP toxicity level in different tissues of *Mizuhopecten yessoensis* in depuration stage (unit: $\mu\text{g STXeq/kg}$)

排出时 间/d	食用组织 PSP		消化腺组织 PSP	
	B 组	C 组	B 组	C 组
0	258.67	50.86	3 208.40	384.99
6	70.17	18.22	1 055.48	95.85

经过在海水和新月菱形藻共培养体系中 6 d 的排出阶段后, 扇贝各组织中 PSP 毒素水平均明显降低。在食用组织中, B、C 组扇贝 PSP 毒素水平分别由 258.67、50.86 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 降低至 70.17、18.22 $\mu\text{g STXeq/kg}$; 在消化腺组织中, B、C 组扇贝 PSP 毒素水平分别由 3 208.4 和 384.99 $\mu\text{g STXeq/kg}$ 降低至 1 055.58 和 95.85 $\mu\text{g STXeq/kg}$ (表 3)。B 组食用和消化腺组织 PSP 毒素水平均显著高于 C 组($P < 0.05$)。

3 讨论

改性粘土技术通过对天然粘土矿物进行改性处理, 使粘土表面电性由负电转变为正电, 实现了对多种赤潮生物去除效率的极大提升(曹西华等, 2006; 张雅琪等, 2013; 邱丽霞等, 2017; 俞志明等, 2019), 目前, 已成为我国近海赤潮治理的首选方法。现场及室内研究均表明, 改性粘土在有效防控赤潮的用量下, 对多种鱼(Zhang *et al*, 2019; 张培培等, 2019)、虾(孙晓霞等, 2000; 宋秀贤等, 2003)、贝(高咏卉等, 2007; 王志富等, 2014; 王梓瞳等, 2019)等养殖生物无不良影响。本研究中 0.2 g/L MC I 对 *A. pacificum* 藻细胞的去除率在 3 h 时即达到了 97%, 在随后的几天中藻

密度始终维持在低水平, 没有出现再次增殖。此外, 低于 0.52 g/L 的 MC I 对虾夷扇贝的滤水率也没有造成显著负面影响($P > 0.05$), 这与以往改性粘土对滤食性贝类影响的研究结果一致。再一次体现了改性粘土在高效去除赤潮生物的同时, 对典型养殖生物无不良影响。

本研究中所使用的 MC I 对虾夷扇贝的滤食行为没有影响, PSP 在扇贝体内的累积主要受到水体中藻细胞密度及藻细胞毒力的影响。宋维佳等(2021)研究发现, MC I 主要是通过去除水体中的有毒藻细胞来降低水体中的总 PSP 含量, 改性粘土是一种绿色环保的除藻材料, 适当用量可以有效降低水体中藻细胞密度, 但不会导致藻细胞大量破裂释放或分泌毒素。因此, 本研究中前 4 d 虾夷扇贝体内 PSP 含量的变化主要受到水体中 *A. pacificum* 藻密度的影响, B、C 两组扇贝组织中 PSP 的变化与藻密度的变化具有较好的对应关系。例如, B 组扇贝食用和消化腺组织中 PSP 毒素水平与藻细胞密度呈现出较强的负相关关系(图 5), 反映出扇贝各组织中 PSP 毒素水平的变化主要源自藻细胞密度的变化。在实验的前 4 d, 生长在 *A. pacificum* 中的 B 组扇贝不断滤食藻细胞, 水中藻密度不断降低, 导致扇贝食用和消化腺组织中 PSP 毒素水平在累积阶段不断上升, 在第 4 d 毒素水平达到最高。而在添加 0.2 g/L MC I 的 C 组中, 在 3 h 时 MC I 即絮凝沉降了体系中 97% 的藻细胞, 此后藻密度始终维持在一个较低的水平, 这大大降低了扇贝摄入有毒藻的几率, C 组扇贝食用和消化腺组织毒素水平在第 2 d 达到高峰, 随后呈下降趋势。累积及排出阶段中, B 组扇贝 PSP 毒素水平均高于 C 组。Li 等(2019)

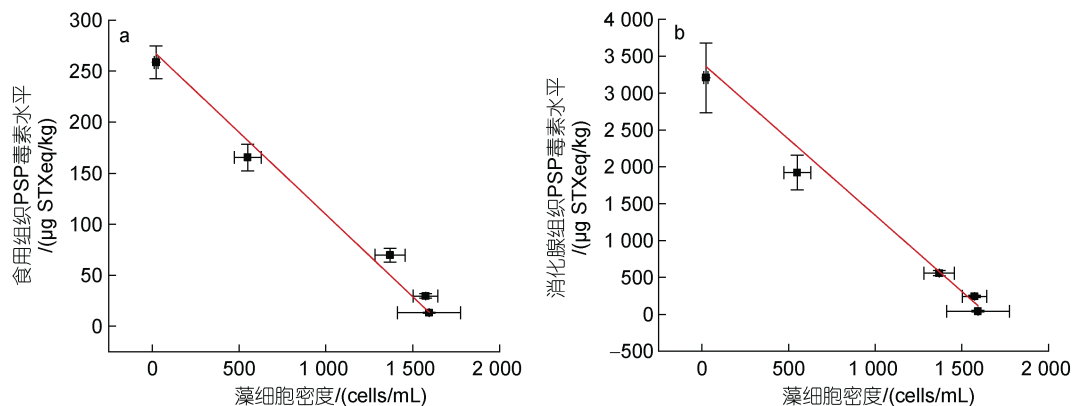


图 5 对照组(B 组)虾夷扇贝不同组织中 PSP 毒素水平与藻密度的关系

Fig.5 Relationship between toxicity level of PSP in different tissues of *Mizuhopecten yessoensis* and algal density of *A. pacificum* in the control group

注: a: 食用组织; b: 消化腺组织

的研究表明, 在 16 d 的 *A. pacificum* 与海湾扇贝共培养实验中, 未添加 MC I 的对照组中, 在 3 h 内扇贝即积累了初始藻液中 73.2% 的 PSP, 而添加 0.1 和 0.5 g/L MC I 后, 扇贝的毒素水平始终保持在一个较低的水平。前人和本研究结果均表明, MC I 能有效絮凝沉降水体中的 *A. pacificum*, 从而能够减少贝类对有毒藻的滤食, 大大地降低了 PSP 在贝类体内的积累, 该研究结果为改性粘土技术在近海贝类养殖水体中的实际应用提供了重要的科学依据。

我国规定上市贝类中 PSP 的安全限量标准为 800 $\mu\text{g STXeq/kg}$, 从安全限量标准来看, 在各个取样时间点, B 组扇贝的食用组织以及 C 组扇贝的两种组织毒素水平均低于安全限量标准, 而生长在较高密度 *A. pacificum* 的虾夷扇贝(B 组), 其消化腺组织的毒素水平在 2 d 后高于安全限量标准。另外, B、C 组扇贝消化腺组织中毒素水平为食用组织的数倍甚至十多倍。消化腺是扇贝主要的毒素累积器官, 建议在食用时剔除消化腺以保证安全。已有学者研究过 PSP 在贻贝、扇贝等体内的累积和排出情况(Kwong *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017), 发现消化腺是 PSP 主要的累积器官, 这与本文的研究结果一致。

多项研究表明, 亚历山大藻和以其为食的贝类体内 PSP 的组分有所差异。如 Kwong 等(2006)的研究发现, 芬迪亚亚历山大藻(*Alexandrium fundyense*)中 PSP 组成中氨基甲酸酯类毒素(GTX1-4、STX、neoSTX)占比仅为 33.4%, 但滤食它的翡翠贻贝(*Perna viridis*)体内此类毒素占比为 53.0%。双壳贝类中 PSP 的转化极为复杂多变, 可发生不同毒素种类间的转化和差向异构体间的转化, 如 PSP11 位 C 原子上的 R2、R3 基团的空间异构化, β 异构体可转化为稳定的 α 异构体, 如 GTX3 \rightarrow GTX2, C2 \rightarrow C1, GTX4 \rightarrow GTX1 等(包振民等, 2021)。Asakawa 等(2005)的研究发现, 滤食塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*) 2 d 后, 相比藻细胞 PSP 组成, 菲律宾蛤仔体内 GTX1 : GTX4 比率提高。在本文的研究中, 当虾夷扇贝滤食了 *A. pacificum* 藻细胞 3 h 后, 与初始藻细胞中的 PSP 组成相比, 扇贝食用和消化腺组织中均未检出藻细胞中所含有的 GTX2、GTX3、GTX4、dcGTX2、dcGTX3 (图 3)。其中, GTX2、GTX3、GTX4 可能在扇贝体内转化为其他组分, 也有可能短时间内被扇贝本身排出。dcGTX2、dcGTX3 本身在藻类中占比较低, 文献中还未记载过这两类毒素向其他 PSP 组分的转化路径, 因此在 3 h 内有可能被扇贝本身排出体外。扇

贝各组织中 C1 : C2 比率降低, 这与贝类中常见的 C2 : C1 的转化有所不同, 可能发生了和其他组分间复杂的转化。3 h 后未在扇贝各组织中检出 GTX4, 但 GTX1 占比相比藻细胞均有所提高, 有理由推断 GTX4 可能向 GTX1 发生了快速转化。在 4 d 的 PSP 累积阶段中, 不论是食用组织还是消化腺组织, B 组和 C 组的 PSP 组成差异不大, 说明改性粘土的添加不会影响扇贝对 PSP 的生物转化过程。经过 6 d 的排出阶段后, C 组扇贝食用组织中 GTX1、B 组和 C 组扇贝消化腺组织中的 C1 占比均有不同程度的提升, 说明 GTX1、C1 的排出速率可能比其他毒素低或其他组分向其发生了转化。

4 结论

(1) 0.2 g/L MC I 能有效絮凝去除水体中大部分的 *A. pacificum* 藻细胞, 并对虾夷扇贝的滤食行为没有影响。

(2) 整个实验过程中, 无论是累积阶段还是排出阶段, MC I 处理后虾夷扇贝食用组织和消化腺组织中 PSP 毒素水平均低于未添加改性粘土的对照组。一定用量 MC I 的添加可通过降低水体中 *A. pacificum* 藻细胞密度, 减少虾夷扇贝对水体中有毒藻的摄入量, 从而降低扇贝食用组织和消化腺组织内 PSP 毒素的积累。

(3) 累积阶段中, MC I 处理组虾夷扇贝食用组织和消化腺组织中 PSP 各组分相对含量与未添加改性粘土的对照组无明显差异, 即本实验用量 MC I 的添加未对虾夷扇贝体内的 PSP 转化造成明显影响。

参 考 文 献

- 王志富, 俞志明, 宋秀贤, 等, 2014. 改性粘土治理有害藻华方法对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)稚贝的影响[J]. 海洋环境科学, 33(6): 817-821, 836.
- 王梓瞳, 宋秀贤, 张悦, 等, 2019. 改性粘土对硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)生长的影响[J]. 海洋与湖沼, 50(3): 692-699.
- 包振民, 孔玲玲, 史姣霞, 等, 2021. 双壳贝类积累转化麻痹性贝毒的研究进展[J]. 中国海洋大学学报, 51(10): 1-11.
- 全国水产技术推广总站, 2018. 2018 水产新品种推广指南[M]. 北京: 中国农业出版社: 97-106.
- 孙晓霞, 张波, 俞志明, 2000. 赤潮防治剂对中国对虾的毒性研究[J]. 海洋环境科学, 19(4): 6-8.
- 时文博, 高丽娜, 韩现芹, 等, 2020. 天津市售主要经济贝类中麻痹性贝类毒素污染现状及特征分析[J]. 河北渔业(2): 29-33.
- 吴海燕, 郭萌萌, 郝晓菲, 等, 2017. 液相色谱-四极杆/线性离子阱复合质谱测定双壳贝类中麻痹性贝类毒素[J]. 海洋

- 与湖沼, 48(3): 508-515.
- 邱江兵, 2014. 双壳贝类对麻痹性贝毒的代谢转化及其生理生化响应[D]. 青岛: 中国海洋大学: 12.
- 邱丽霞, 俞志明, 曹西华, 等, 2017. 改性粘土对球形棕囊藻(*Phaeocystis globosa*)和东海原甲藻(*Prorocentrum donghaiense*)的去除作用[J]. 海洋与湖沼, 48(5): 982-989.
- 宋秀贤, 俞志明, 高咏卉, 2003. 一种有效去除赤潮生物的粘土复合体系[J]. 应用生态学报, 14(7): 1165-1168.
- 宋维佳, 宋秀贤, 李靖, 等, 2021. 改性粘土絮凝后残留的太平洋亚历山大藻(*Alexandrium pacificum*)毒素变化研究[J]. 海洋与湖沼, 52(4): 917-924.
- 张培培, 宋秀贤, 李靖, 等, 2019. 改性粘土絮凝法对大西洋鲑(*Salmo salar*)存活及生理生化影响初探[J]. 海洋与湖沼, 50(3): 684-691.
- 张雅琪, 俞志明, 宋秀贤, 等, 2013. 改性黏土对褐潮生物种 *Aureococcus anophagefferens* 的去除研究[J]. 海洋学报, 35(3): 197-203.
- 俞志明, 邹景忠, 马锡年, 1994. 一种提高粘土矿物去除赤潮生物能力的新方法[J]. 海洋与湖沼, 25(2): 226-232.
- 俞志明, 陈楠生, 2019. 国内外赤潮的发展趋势与研究热点[J]. 海洋与湖沼, 50(3): 474-486.
- 高咏卉, 俞志明, 宋秀贤, 等, 2007. 改性粘土絮凝法对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)稚贝的影响[J]. 海洋通报, 26(3): 53-60.
- 唐赢中, 胡章喜, 邓蕴彦, 2016. 休眠孢囊作为甲藻有害藻华年际频发和地理扩散一种关键机制的研究进展[J]. 海洋科学集刊: 132-154.
- 曹西华, 宋秀贤, 俞志明, 等, 2006. 有机改性粘土去除赤潮生物的机制研究[J]. 环境科学, 27(8): 1522-1530.
- 梁玉波, 李冬梅, 姚敬元, 等, 2019. 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, 50(3): 511-524.
- ANDERSON D M, CEMBELLA A D, HALLEGRAEFF G M, 2012. Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management [J]. Annual Review of Marine Science, 4: 143-176.
- ASAKAWA M, BEPPU R, TSUBOTA M, *et al*, 2005. Paralytic shellfish poison (PSP) profiles and toxification of short-necked clams fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* [J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 46(6): 251-255.
- BRICELJ V M, SHUMWAY S E, 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation [J]. Reviews in Fisheries Science, 6(4): 315-383.
- COUGHLAN J, 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions [J]. Marine Biology, 2(4): 356-358.
- KWONG R W M, WANG W X, LAM P K S, *et al*, 2006. The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates [J]. Aquatic Toxicology, 80(1): 82-91.
- LI Y, SUN X, HU X, *et al*, 2017. Scallop genome reveals molecular adaptations to semi-sessile life and neurotoxins [J]. Nature Communications, 8(1): 1721.
- LI J, SONG X X, ZHANG Y, *et al*, 2019. Effect of modified clay on the transition of paralytic shellfish toxins within the bay scallop *Argopecten irradians* and sediments in laboratory trials [J]. Aquaculture, 505: 112-117.
- LIU S Y, YU Z M, SONG X X, *et al*, 2017. Effects of modified clay on the physiological and photosynthetic activities of *Amphidinium carterae* Hulburt [J]. Harmful Algae, 70: 64-72.
- MASCAREÑO A, CORDERO R, AZÓCAR G, *et al*, 2018. Controversies in social-ecological systems: lessons from a major red tide crisis on Chiloe Island [J]. Ecology and Society, 23(4): 15.
- OSHIMA Y, 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins [J]. Journal of AOAC International, 78(2): 528-532.
- TURNER A D, MCNABB P S, HARWOOD D T, *et al*, 2015. Single-laboratory validation of a multitoxin ultra-performance LC-hydrophilic interaction LC-MS/MS method for quantitation of paralytic shellfish toxins in bivalve shellfish [J]. Journal of AOAC International, 98(3): 609-621.
- ZHANG Y, SONG X X, YU Z M, *et al*, 2019. Impact assessment of modified clay on embryo-larval stages of turbot *Scophthalmus maximus* L. [J]. Journal of Oceanology and Limnology, 37(3): 1051-1061.
- ZHANG Y, YU Z M, SONG X X, *et al*, 2018. Effects of modified clay used for the control of harmful algal blooms on *Alexandrium pacificum* cysts [J]. Harmful Algae, 72: 36-45.
- ZHU J N, YU Z M, HE L Y, *et al*, 2018. Molecular mechanism of modified clay controlling the brown tide organism *Aureococcus anophagefferens* revealed by transcriptome analysis [J]. Environmental Science & Technology, 52(12): 7006-7014.

EFFECT OF MODIFIED CLAY ON PARALYTIC SHELLFISH POISONING IN *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS*

MENG Xiao-Jun^{1, 2, 3, 4}, SONG Xiu-Xian^{1, 2, 3, 4}, ZHANG Yue^{1, 2, 3, 4}, SONG Wei-Jia^{1, 2, 3, 4},
ZHANG Pei-Pei^{1, 2, 3, 4}, SHEN Hui-Hui^{1, 2, 3, 4}, YU Zhi-Ming^{1, 2, 3, 4}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory of Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract Modified clay (MC) has been a widely recognized technology for controlling harmful algal blooms (HABs). However, the impact of modified clay on the accumulation and depuration of toxins in benthic filter-feeding shellfish is unclear. Changes in the concentration and composition of paralytic shellfish poisoning (PSP) in edible tissue and digestive gland of scallop *Mizuhopecten yessoensis* were investigated after flocculating *Alexandrium pacificum* with polyaluminium chloride modified clay (MC I) in laboratory experiments. Results show that after exposure to *A. pacificum* for 3 h, the toxicity level in the edible tissue of the scallop increased rapidly from the undetected level in the blank group to 13.24 µg STXeq/kg in the control group (with no addition of MC I), and the toxicity level in the digestive gland increased from 0.68 to 42.97 µg STXeq/kg. On Day 4, the toxicity level in the edible tissue and digestive gland of the control group reached the highest, which were 258.67 and 3 208.40 µg STXeq/kg, respectively. In the experimental group, 97% of *A. pacificum* algae cells were flocculated and settled by 0.2 g/L MC I after 3 h. At this time, the toxicity level in the edible tissue and digestive gland of the scallop were much lower than those in the control group, which were 6.33 and 18.39 µg STXeq/kg, respectively. On Day 2, the toxicity level in edible tissue and digestive gland reached 98.92 and 574.54 µg STXeq/kg, which remained significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), and then showed a downward trend. In the toxin depuration stage, the toxicity level in the edible tissue and digestive gland of the scallop in the experimental group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). Moreover, difference in the PSP composition in the edible tissue and digestive gland between the control group and the experimental group in the accumulation stage was small, indicating that the modified clay had no significant effects on the PSP transformation in the scallop. Therefore, the modified clay can effectively flocculate and remove *A. pacificum* algae cells in water, prevent *Mizuhopecten yessoensis* from ingesting toxic algal cells, and thus reduce the accumulation of PSP in shellfish. This study provided a scientific basis for the application of MC I to control toxic blooms in benthic shellfish culture water.

Key words modified clay; *Alexandrium pacificum*; *Mizuhopecten yessoensis*; paralytic shellfish poisoning