

# 麻痹性贝毒 PSP 在紫贻贝体内的 累积、转化与排出\*

颜 天 傅 萌 李 钧 于仁诚 周名江

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 于 1998 年 9 月在青岛鲁迅公园附近礁石区采集紫贻贝 (*Mytilus edulis*), 采用实验室培养的方法, 初步研究了塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*, ATHK) 产生的麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poison, PSP) 在其体内累积、转化与排出的规律。结果表明, 在累积实验阶段, 紫贻贝内脏和肌肉中的 PSP 毒素含量均随实验时间的延长而逐渐增加, 累积实验结束时, 平均每只贝体内的 PSP 毒素含量为 13.40 nmol, 毒性水平为 12.24  $\mu$ g STX Eq/100g。紫贻贝内脏中的毒素含量远远高于肌肉, 内脏中 PSP 毒素占贝体内 PSP 毒素总量的 97.5%。在 8 天的排出实验阶段, 贝体内的 PSP 毒素总量呈下降趋势, 实验结束时, PSP 毒素共排除了约 50%, 每天排除率约为 9%。

**关键词** 塔玛亚历山大藻, 麻痹性贝毒, 紫贻贝, 累积, 排出, 转化

**中图分类号** X55

麻痹性贝毒 (Paralytic Shellfish Poisoning, PSP) 是一类主要的藻毒素, 近来的研究表明这类毒素在全球的分布越来越广 (Dale *et al.*, 1978; Hallegraeff, 1995)。PSP 毒素主要是通过食用贝类滤食累积威胁人类的健康与生命安全, 因此科学家们已经开始进行了 PSP 毒素与贝类相互关系的研究, 比较了几种主要贝类对 PSP 毒素累积和排出的特点 (Shumway, 1995; Bricelj *et al.*, 1998), 我国的有关部门也制定了相应的贝类卫生质量标准 and 法律法规, 对贝类产品的贝毒含量、采集和销售途径等作出了明确的规定 (中华人民共和国渔政渔港管理局, 1997<sup>1)</sup>; 农业部, 1998<sup>2)</sup>)。有害赤潮的不断发生严重威胁着我国的生态环境与海产养殖业 (黄长江等, 1999, 2000; 吴玉霖等, 2001), 在我国沿海海域的一些地区也发现了 PSP 毒素污染的贝类样品 (Zhou *et al.*, 1999; 江天久等, 2000)。由于对 PSP 毒素的分析比较复杂, 我国在 PSP 毒素与贝类的相互关系方面的研究报道很少 (于仁诚等, 1998), 而针对我国有毒藻和贝类分布特点, 研究 PSP 毒素在贝类体内的累积和

\* 国家自然科学基金重大资助项目, 39790110 号; 国家自然科学基金资助项目, 49576301 号、49906007 号; 国家自然科学基金主任基金资助项目, 39950001 号; 山东省科委资助项目“鲜活贝类卫生优质调控机理研究”; 中国科学院知识创新工程资助项目, KZCX2-206 号。颜 天, 女, 出生于 1969 年 1 月, 副研究员, E-mail: tianyan@ms.qdio.ac.cn

1) 中华人民共和国渔政渔港管理局, 1997. 关于印发《贝类生产环境卫生监督管理暂行规定》的通知. 渔环 (1997) 6 号

2) 农业部, 1998. 关于制订《贝类生产环境卫生监督管理暂行规定》的有关情况说明及实施意见的通知. 农渔环 (1998) 002 号

收稿日期: 2000-07-06, 收修改稿日期: 2000-09-26

排出规律更是一个关系到消费者生命安全和贝类养殖业发展的急待进行的重要课题,因此,本文选用一种分离于南海的 PSP 产毒藻——塔玛亚历山大藻,以分布广泛且通常作为污染指示生物的紫贻贝为研究对象,对该藻所产生的 PSP 毒素在紫贻贝体内的累积、排除和转化规律进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

紫贻贝(*Mytilus edulis*)于1998年9月采自青岛鲁迅公园附近礁石[壳高为(22±2)mm],用刀刮除其上附着物,实验室暂养,适量通气,每日投喂小球藻两次。

塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)ATHK藻株由暨南大学提供,实验室内单种培养,选用 $f/2$ 培养液,温度为20℃,光照强度为3000lx,光照周期为L:D=12h:12h。

实验用海水是从胶州湾外太平角引入水族楼的无污染海水,使用前经沉淀沙滤,脱脂棉过滤。温度为20℃,盐度为32。

### 1.2 方法

实验容器为玻璃缸,每缸10L海水,实验组和对照组分别设置两个平行,实验起始时,每组105只贻贝。

**1.2.1 累积实验** 共进行8d,每天取2—3L静止期的塔玛亚历山大藻液,经20 $\mu$ m筛绢过滤浓缩后,重新悬浮于1700ml新鲜海水中,混匀,取样固定,用倒置显微镜计数。取50ml抽滤至滤膜(Whatman GF/C),85℃烘箱烘干后,置于4℃冰箱保存,留待HPLC分析毒素含量。实验组每日投喂200ml藻液4次(细胞总数见表2),对照组以海水代替。另外,每组每天再投喂小球藻两次。每24h换水一次,并每天从实验组中取出6只贻贝作为一个样品,解剖分为内脏部分和肌肉部分,分别称湿重,真空冷冻干燥(LABCONCO冷冻干燥机)后,袋装保存留待HPLC分析毒素含量。毒素含量为毒素在单位重量贝肉(湿重g)中的毒素量,对照组也用同样方法在实验的第2、3、7天时取样。

**1.2.2 排出实验** 共进行8d,停止投喂塔玛亚历山大藻,每天只投喂小球藻两次。每天从实验组内取贝样,方法与累积实验时相同。对照组在实验结束时取样。

**1.2.3 HPLC毒素分析** 采用Thielert(1991)方法,样品的毒素分析分为醋酸提取和盐酸水解两步。

第一步,取适量冷冻干燥的贝样,加入1ml的0.03mol/L醋酸溶液置入Eppendorf管中,经超声处理5—10min后,静止抽提15—20min。14000r/min离心20min,取上清液并用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤后,用于下一步水解和HPLC分析。

第二步,取150 $\mu$ l的醋酸提取液,加入1mol/L盐酸溶液37 $\mu$ l,在90℃下反应15min后,加入1mol/L醋酸钠75 $\mu$ l,用于HPLC分析。

藻类样品的处理分析方法同上。

液相色谱系统包括:AS-4000自动进样器和L-6200高压泵(Merck-Hitachi)、两个柱后衍生泵(Shimadzu)、RF551荧光检测器(Shimadzu)、1ml CRX390柱后衍生装置(Pickering Laboratories)以及D-6000液相色谱管理器。色谱柱为Supelcosil-C18柱(Supelco No. 58355, 250×4.6mm)。荧光发射波长为333nm,激发波长为390nm,柱后衍生温度为50℃。

分析过程采用的溶剂均为 HPLC 级, 离子对试剂辛基磺酸钠为 Sigma 产品, 其他的化学药品均为分析纯试剂。液相色谱用水是 Millipore 超纯水过滤装置过滤。分析中使用的标准毒素购自加拿大。

## 2 结果与讨论

### 2.1 塔玛亚历山大藻的毒素含量及投喂量

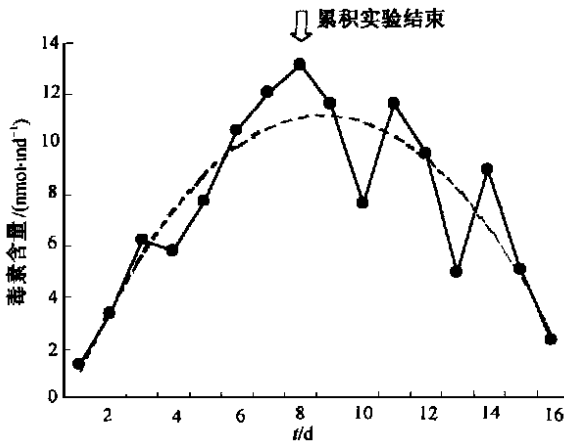


图1 在累积和排出实验过程中 PSP 毒素含量在紫贻贝体内的变化情况

Fig. 1 PSP contents in *Mytilus edulis* during and after exposed to *A. tamarense*

实验选用的是静止期的塔玛亚历山大藻, PSP 毒素的总含量和毒素各组分含量见表 1, 毒素含量为 37.48fmol/cell, 其 PSP 毒素的主要组分为 GTX1, 4, 含量为 32.44fmol/cell, 占 PSP 毒素的总含量的 87%。在累积实验阶段, 每天投喂塔玛亚历山大藻的细胞总数、平均每只紫贻贝的 PSP 毒素投喂量以及累积投喂量见表 2。

### 2.2 毒素累积过程

整个实验过程中紫贻贝无死亡, 也没有明显的不良反应。对照实验组的贝样中无 PSP 毒素检出。在累积实验阶段, 内脏和肌肉中的 PSP 毒素量都随着时间的延长而逐渐增加, 如图 1 和表

2 所示。

表 1 静止期塔玛亚历山大藻产生的 PSP 毒素组分及含量

Tab. 1 The Profiles and contents of PSP produced by *A. tamarense* at stationary phase

PSP 组分	C1	C2	GTX1, 4	GTX2	GTX3	B1	B2	NEO	STX
分子量	491	475	411	395	395	379	395	315	299
各毒素含量 (fmol/cell)	2.65	0.86	32.44	0.24	0.05	0.12	0.64	0.48	0.00
PSP 总含量	37.48fmol/cell (毒性为 11pg STX Eq/cell)								

注: C1、C2 和 B1、B2 为 N-磺酰氨基酰胺基类毒素; GTX1-4 为膝沟藻毒素 1-4; NEO 为新石房蛤毒素; STX 为石房蛤毒素

累积实验结束时, 平均每只贝体内的 PSP 毒素量为 13.40nmol, 累积率为 12.45% (相对于投喂总量), 毒性水平相当于 12.24 $\mu$ gSTX Eq/100g, 还未达到的贝类禁止食用的卫生标准 (80 $\mu$ gSTX Eq/100g) (周宏农, 1999)。PSP 毒素分布于紫贻贝内脏组织和肌肉中, 累积阶段结束时, 平均每只贝体内内脏中的 PSP 毒素量为 13.07nmol, 平均每只贝体内肌肉中的 PSP 毒素量为 0.33nmol (表 2)。

PSP 毒素各组分 GTX1, 4、GTX2、GTX3、NEO、dcSTX、STX 在累积实验阶段含量一直呈逐渐上升的趋势, 图 2 显示了这些主要毒素组分在紫贻贝内脏中含量的变化。

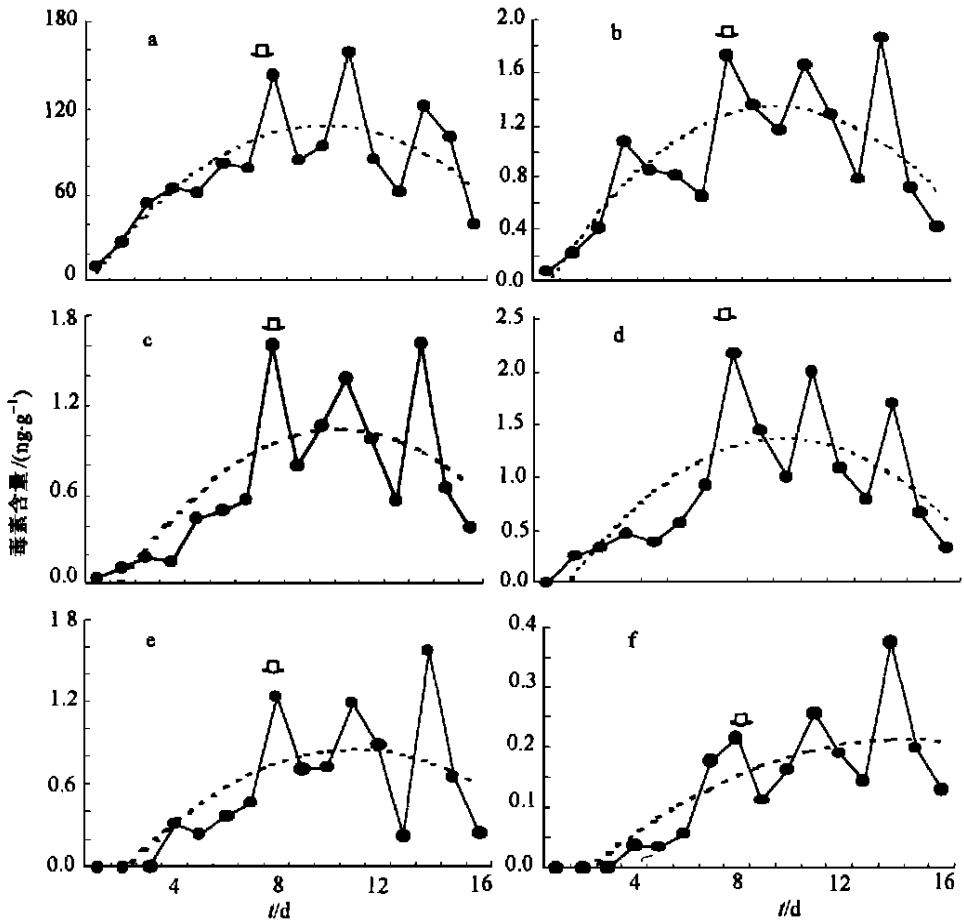


图 2 PSP 毒素各主要组分在紫贻贝内脏中含量变化

Fig. 2 Contents of main PSP toxins in visceral of *Mytilus edulis* during the experiments

表 2 累积实验过程中 PSP 毒素的投喂量和紫贻贝毒素累积状况

Tab. 2 PSP amount of *A. tamarense* and its accumulation in *Mytilus edulis* during the accumulation period

实验时间(d)	1	2	3	4	5	6	7	8
藻细胞总数( $\times 10^7$ /d)	5.6	5.1	4.0	2.3	2.0	1.9	1.8	2.3
藻 PSP 总量(nmol/d)	2113	1920	1498	865	753	698	682	855
贻贝个数/组	105	99	93	87	81	75	69	63
PSP 平均投喂量[nmol/(ind·d)]	20.13	19.40	16.11	9.95	9.30	9.32	9.88	13.58
PSP 累积投喂量(nmol/ind)	107.67							
内脏所含 PSP 量(nmol/ind)	1.37	3.35	6.24	5.79	7.74	10.53	12.00	13.07
内脏的总累积率	13.07/107.67= 12.14%							
肌肉所含 PSP 量(nmol/ind)	0.01	0.02	0.05	0.12	0.23	0.11	0.17	0.33
肌肉的总累积率	0.33/107.67= 0.31%							
总累积率	(13.07+ 0.33)/107.67= 12.45%							

Bricelj 等(1990)也曾对紫贻贝进行了 PSP 毒素的累积研究,他们选择了一种高毒性的 *Alexandrium fundyense* (strain GT 429), 毒性为 66pg STX Eq/cell, 是本实验藻株毒性的 6 倍。紫贻贝暴露 12—13 天时毒素含量会达到最高 ( $4.5 \times 10^4 \mu\text{g STX Eq/100g}$ ), 若暴露于高密度的这种藻细胞中 1h, 贝体内的毒性水平就会超过贝类的安全食用标准 ( $80 \mu\text{g STX Eq/100g}$ )。在本实验中, 藻株的毒性较低, 且累积时间相对较短, 很可能还未达到累积饱和点, 所以紫贻贝累积后的毒性也相对较低。可见, 贝类摄食的有毒藻的毒性大小、有毒藻密度和摄食时间与贝类累积后的毒性水平有直接关系, 但贝类本身的特性也决定着毒素在贝体内的累积状况。已有的研究表明, 紫贻贝的神经元轴突对 PSP 毒素的主要组分 STX 不敏感, 因此能快速累积毒素; 而沙海螂等对 STX 敏感的生物, 其毒素累积率非常低 (Shumway *et al.*, 1987)。紫贻贝分布广, 广泛应用于污染监测, 它对藻毒素的累积先于其他贝类, 因此是一个良好的藻毒素污染早期监测的指示生物, 利用它进行的调查和实验结果也易于相互比较。

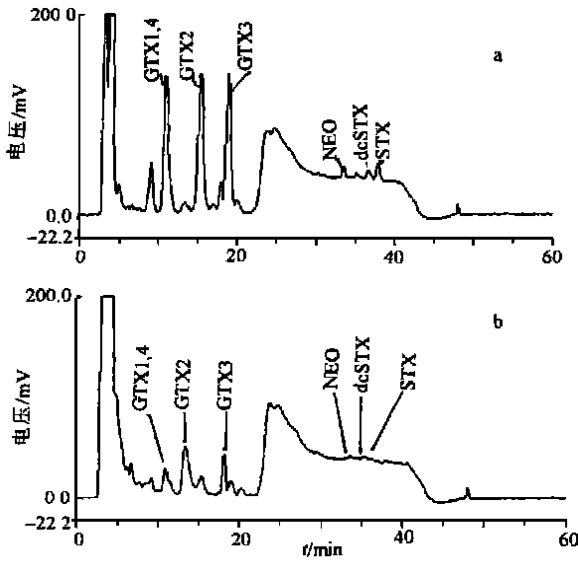


图 3 紫贻贝内脏(a)和肌肉(b)中 PSP 毒素的 HPLC 色谱图(第 13 天)

Fig. 3 Profiles of PSP in visceral (a) and muscles (b) of *Mytilus edulis* (the 13th day)

### 2.3 毒素在紫贻贝体内的分布

内脏与肌肉中 PSP 毒素分析的色谱图(图 3)显示了紫贻贝内脏和肌肉中所含 PSP 毒素的差异。由表 2 可知, 平均每只紫贻贝内脏的 PSP 毒素量为 13.07nmol, 累积率为 12.14%, 而平均每只紫贻贝肌肉中的 PSP 毒素量为 0.33nmol, 累积率只有 0.31%, 内脏中累积的 PSP 毒素占贝体内毒素总量的 97.5%。结果表明, 紫贻贝内脏是 PSP 毒素的主要分布部位。作者在实验时没有对内脏与肌肉做进一步的分离解剖, 消化系统在紫贻贝内脏的部分占较大比例, 有毒藻在被摄食后, 很可能首先贮存和累积在这里。这与 Bricelj 等(1990)的结果一致, 在他们的实验中, PSP 毒素在紫贻贝体内累积达到饱和后, 紫贻贝的肝脏中贮有摄入毒素总量

的 79%, 而且肝脏中的毒素组成更接近于被摄食细胞的毒素组成。

### 2.4 PSP 毒素的相互转化

紫贻贝摄食了塔玛亚历山大藻后, 贝类体内与藻细胞中各毒素组分的相对比例比较发生了很大的变化。图 4 比较了藻、贝体内的各毒素组分。可以看出由藻细胞到紫贻贝体内, 除了 GTX1,4 变化不大以外, 毒素 C1、C2、GTX2、NEO 所占比例下降, GTX3、B1-2 的比例增加, 而 STX 和 dcSTX 从无到有, 可见来源于藻的毒素组分在贝类体内发生了转化。Oshima(1995)在进行 PSP 毒素的研究时发现, 贝体内的毒素存在着相互转化, 转化主要包括两种类型, 即化学转化和酶促转化。大致为 C1、C2 可转化为 B1、GTX3;

GTX2 可转化为 GTX3、STX; NEO 可转化为 STX; deSTX 可由 B1 和 STX 转化而来; GTX1, 4 可由 C3、C4 转化而来。

在此实验中, GTX1, 4 在藻细胞中和贝体内占据着相似的比例, 是最主要的毒素组分。贝体内的 GTX1, 4 除了来源于藻类, 还可通过 C3、C4 毒素转化而来。由于在本实验的藻类和贝类样品里均无 C3、C4 存在, 而且 GTX1, 4 不再转化成其他形式, 所以本实验中紫贻贝体内的 GTX1, 4 来源于藻细胞, 可以直接反应出这种有毒藻的毒素传递到紫贻贝体内的动态过程, 而其他毒素从藻细胞毒素传递到贝体内后, 由于各种转化作用使这些毒素的含量发生了较大的变化。

### 2.5 毒素排出过程

停止投喂塔玛亚历山大藻后, PSP 毒素在贝体内的含量有下降的趋势(图 1), 但这部分数据的波动性比较大, 一方面由于毒素在此阶段复杂的相互转化, 另一方面可能是由于贝类个体的差异及分析系统可能存在的不稳定性造成的。经过 8d 的毒素排出实验, PSP 毒素大约排除了 50%, 每天的排除率约为 9%。在同类实验中, Bricelj 等(1998) 比较几种贝类的毒素排出过程, 发现紫贻贝通常是毒素排出较快的贝类, 每天的排除率约为 15%。在他们的实验中紫贻贝累积后的毒性水平比本实验的高千倍以上(见本文 2. 2), 有可能紫贻贝在毒性水平高时, 其自净排除率也会保持在较高的水平, 因此, 本实验的排除率相对较低。

在排出实验阶段, PSP 毒素各主要组分在内脏的含量变化趋势却各不相同(图 2), GTX1, 4 与 PSP 毒素总量表现出相同的下降趋势, 但其他毒素 GTX2、GTX3、NEO、deSTX 均无明显下降, STX 的含量反而呈明显上升趋势, 这正是由于毒素在此阶段复杂的相互转化造成的。对于毒素的排出规律还有待于深入了解, 以便为下一步研究贝类毒素净化技术提供依据。

### 3 结语

通过以上塔玛亚历山大藻(ATHK)产生的麻痹性贝毒 PSP 在紫贻贝体内的累积、分布、转化与排出的实验, 可以看出 PSP 毒素能通过紫贻贝摄食而在其体内累积, 内脏是主要的毒素分布部位, 毒素在紫贻贝体内能产生一系列的相互转化, 停止摄食有毒藻后, 紫

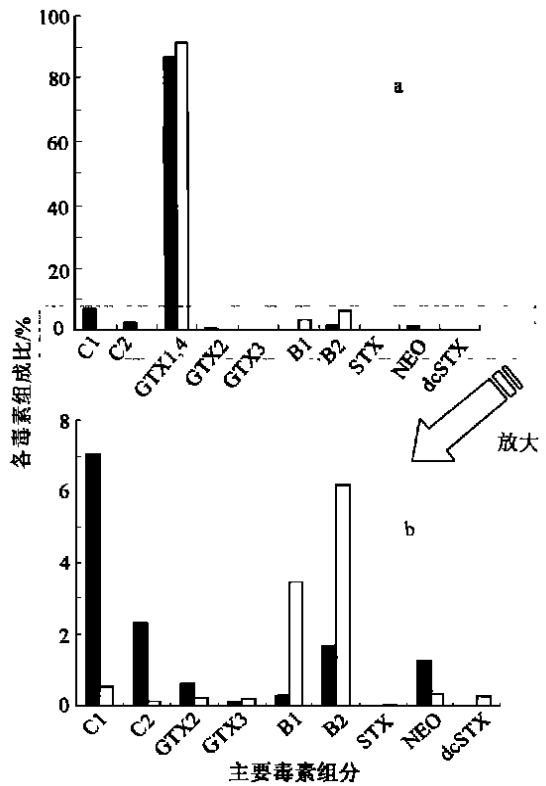


图 4 塔玛亚历山大藻与紫贻贝体内 PSP 毒素组分的比较

Fig. 4 Comparison of PSP profiles between *A. tamarense* and *M. edulis*

■塔玛亚历山大藻 (*A. tamarense*); □紫贻贝 (*M. edulis*)

贻贝能够通过自净逐渐排出毒素。

### 参 考 文 献

- 于仁诚,周名江,1998. 麻痹性贝毒研究进展. 海洋与湖沼, 29(3): 330—338
- 江天久,尹伊伟,骆育敏等,2000. 大亚湾和大鹏湾麻痹性贝类毒素动态分析. 海洋环境科学, 19(2): 1—5
- 吴玉霖,周成旭,张永山等,2001. 烟台四十里湾海域红色裸甲藻赤潮发展过程及其成因. 海洋与湖沼, 32(2): 159—167
- 周宏农,1999. 水产品藻源毒素检测操作手册. 基隆:水产出版社,42—44
- 黄长江,董巧香,1999. 1997年底中国东南沿海大规模赤潮原因生物的形态分类与生态学特征. 海洋与湖沼, 30(6): 581—590
- 黄长江,董巧香,2000. 1998年春季珠江口海域大规模赤潮原因生物的形态分类和生物特征 I. 海洋与湖沼, 31(2): 197—204
- Bricelj V M, Lee J H, Anderson D M, 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Mar Ecol Progr Ser, 63: 177—188
- Bricelj V M, Shumway S E, 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. Rev Fish Sci, 6(4): 315—383
- Dale B, Yentsch C M, 1978. Red tide and paralytic shellfish poisoning. Oceanus, 21: 41—49
- Hallegraeff G M, 1995. Harmful Algal Blooms: A Global Overview. In: Hallegraeff G M, Anderson D M, Cembella A D ed. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides. No. 33, UNESCO, 1—18
- Oshima T, 1995. Chemical and Enzymatic Transformation of Paralytic Shellfish Toxins in Marine Organisms. In: Lassus P, Arzul G, Erardle D E et al ed. Harmful Marine Algal Blooms. Paris: Lavoisier, 475—480
- Shumway S E, Cucci T L, 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on feeding and behavior of bivalve molluscs. Aquatic Toxicol, 10: 9—27
- Thielert G, Kaiser I, Luckas B, 1991. HPLC Determination of PSP toxins. In: Freym J M ed. Proceedings of Symposium of Marine Biotoxins, Paris, January 1991, Editions CNEVA, B P 19, F- 94701 Maisons Alfort Wintersteinger R. And Berlitz G. 1989. Elektronchemische Detektion in der HPLC ein hochempfindliches Analysesystem. GIT Supplement 3/89: 19—26
- Zhou M, Li J, Bernd L et al, 1999. A recent shellfish toxin investigation in China. Mar Pollut Bull, 39(1): 331—334

## ACCUMULATION, TRANSFORMATION AND ELIMINATION OF PSP IN *MYTILUS EDULIS*

YAN Tian, FU Meng, LI Jun, YU Ren-Cheng, ZHOU Ming-Jiang  
(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** Using a PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) producing strain *Alexandrium tamarense* (ATHK), we studied toxin accumulation, transformation and elimination of PSP in mussels *Mytilus edulis*. The results show that the PSP content increased with time both in visceral and muscle during an 8-day accumulation period when mussels were feeding with *A. tamarense*. At the end of the accumulation period, the mean toxin amount and accumulation efficiency in each mussel were 13.40nmol, 12.45% (comparing to the total PSP amount from algae), respectively. The toxicity level was 12.24 $\mu$ gSTX Eq/100g, which did not reach the sanitation standard (80 $\mu$ gSTX Eq/100g). The accumulation of visceral was more intense than that of muscles. The toxin amount in visceral of average each mussel was 13.07nmol, with its accumulation efficiency being 12.14% at the end of accumulation period, whilst those of muscles were only 0.33nmol and 0.31%, respectively. The percentage of toxin accumulated in visceral was 97.5% of total, indicating that visceral was the main part for toxin accumulation in shellfish. There are also different toxin profiles of the alga and mussel, indicating that the toxins may have transformed in mussels. During the eight-day elimination period, the amount of total PSP decreased with an elimination rate of about 9% per day. Except GTX1, 4, the main PSP composition in muscle which decreased too, GTX2, GTX3, NEO and dsSTX did show decrease, but STX increased during the elimination period. This was probably caused by complicated transformation among PSP compositions. Further studies will focus on PSP depuration of shellfish to provide techniques for developing sanitary shellfish industry in China.

**Key words** *Alexandrium tamarense*, PSP, *Mytilus edulis*, Accumulation, Elimination, Transformation