

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20240730001

http://www.yykxjz.cn/

邓宇翔, 程玲, 吴海燕, 袁承旭, 谭志军, 郑关超. 长岛附近海域夏秋季贝类毒素污染特征及潜在来源解析. 渔业科学进展, 2025, 46(2): 122–132

DENG Y X, CHENG L, WU H Y, YUAN C X, TAN Z J, ZHENG G C. Pollution characteristics and potential sources of shellfish toxins in summer and autumn in the sea area near Changdao Island. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(2): 122–132

长岛附近海域夏秋季贝类毒素污染特征 及潜在来源解析*

邓宇翔^{1,2} 程玲³ 吴海燕² 袁承旭⁴ 谭志军^{2,5} 郑关超^{2①}

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306;

2. 农业农村部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071;

3. 山东省海洋生态修复重点实验室 山东省海洋资源与环境研究院 山东 烟台 264006;

4. 长岛海洋生态文明综合试验区海洋经济促进中心 山东 烟台 265800;

5. 海水养殖生物育种与可持续产出全国重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)

摘要 黄渤海海域的有害赤潮是研究者与监管部门持续关注的环境问题,长岛县地处黄渤海交汇海域,有潜在的海洋毒素污染风险。本研究以6—10月长岛附近海域贝类、浮游植物、沉积物为研究对象,通过分析不同样品中麻痹性贝类毒素(paralytic shellfish toxins, PSTs)、脂溶性贝类毒素(lipophilic shellfish toxins, LSTs)、软骨藻酸贝类毒素(domoic acid, DA)的残留及污染特征,探究长岛附近海域贝类毒素污染情况及潜在风险来源。结果显示,LSTs和DA的检出率、含量均较低。PSTs在不同月份、样品中均有检出,其中,9月贝类与浮游植物PSTs含量最高,但所有样品均未超出安全限量。在浮游植物高通量测序结果中发现,6—10月均有亚历山大属藻类(*Alexandrium* spp.)检出,9月丰度最高,且在沉积物中也发现亚历山大属藻孢囊,推测本研究中PSTs产毒藻可能为亚历山大属藻类。虽然长岛附近海域PSTs含量较黄渤海其他海域低,但仍存在PSTs污染潜在风险,应加强对贝类毒素污染监测。本研究结果可为长岛附近海域水产养殖区毒素污染的早期预警提供基础数据。

关键词 贝类毒素;长岛;污染特征;潜在来源

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)02-0122-11

黄渤海地区拥有丰富的渔业资源,是全国重要的贝类养殖海域。黄海西以渤海海峡与渤海相连,此海域海水具有低温高盐的特点,适合深海水产品的养殖,是著名的“海上粮仓”(金显仕等,2023)。渤海是我

国最大的半封闭型内海,也是重要的海洋生物产卵场、育幼场和索饵场。山东省烟台市长岛县位于胶东和辽东半岛之间,黄渤海交汇处,拥有优越的地理位置和海洋环境,是全国首个海上经济开发区,也是山

* 国家自然科学基金面上项目(32472451; 42276219)、国家自然科学基金青年项目(42306162)、山东省自然科学基金青年项目(ZR2023QC148)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022023006)、中国水产科学研究院基本科研业务费(2023TD76; 2023TD28)和国家现代农业(贝类)产业技术体系专项资金(CARS-49)共同资助。邓宇翔, Email: dyxydsa@163.com

① 通信作者: 郑关超, 工程师, Email: zhenggc@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2024-07-30, 收修改稿日期: 2024-09-10

东重要的贝类养殖区域。2023 年山东扇贝产量为 1 023 104 t, 约占全国扇贝总产量的 55.17% (农业农村部渔业渔政管理局等, 2024)。然而, 环黄渤海经济圈在工业化和城市化进程中向黄渤海排放了大量工业污染物, 海洋环境严重富营养化(李奇龙等, 2024)。水体富营养化会导致藻类暴发式增长或聚集, 从而导致有害藻华产生, 严重影响当地贝类养殖与安全。研究发现, 山东近海均有赤潮暴发的记录, 长岛县海域、烟台四十里湾是最常暴发赤潮灾害的区域(周健等, 2020)。有毒赤潮可能会产生海洋毒素, 引起海洋生物的大量死亡, 同时可能通过鱼类和贝类的富集最终对人类产生毒害作用(Yan *et al*, 2024)。

黄渤海海域的产毒藻种类众多, 该海域浮游植物、水体基质中已检出多种贝类毒素。产脂溶性贝毒(lipophilic shellfish toxins, LSTs)的鳍藻属(*Dinophysis* spp.)在北黄海海域被检出(孙洪潇等, 2023)。产软骨藻酸毒素(domoiic acid, DA)的伪菱形藻(*Pseudo-nitzschia*)在北黄海獐子岛典型虾夷扇贝养殖区与烟台四十里湾少量检出(Zhao *et al*, 2024)。黄渤海海域的水体里也同样存在贝类毒素, Chen 等(2018)在黄海和渤海近岸表层海水样品中检测到了扇贝毒素(pektenotoxin, PTX)、大田软海绵酸毒素(okadaic acid, OA)、鳍藻毒素(dinophysistoxins, DTX)、裸甲藻亚胺毒素毒素(gymnodimine, GYM)等多种 LSTs; Tang 等(2022)在秦皇岛附近海域水体中检出了膝沟藻毒素(gonyautoxin, GTX)1/4、GTX2/3 等多种 PSTs; Chen J 等(2023)对渤海和北黄海的海水、悬浮颗粒物和浮游植物中的 DA 进行了全海域调查, 发现渤海、黄海北部和莱州湾近岸和外海广泛存在溶解态 DA。

长岛海域贝毒研究较少, 但仍存在 PSTs 污染。在山东长岛海域记录到能够产生 PSTs 的亚历山大属藻类(*Alexandrium* spp.)赤潮, 导致大量网箱养殖鱼类死亡(于仁成等, 2016a)。1990—2020 年, 在长岛县南隍城岛海域监测到产麻痹性贝毒(paralytic shellfish toxins, PSTs)的塔玛亚历山大藻(*A. tamarense*)赤潮, 受灾面积累计 2.37 km², 而在烟台四十里湾、威海近海也检测到产 PSTs 的裸甲藻属(*Gymnodinium* spp.), 受灾面积累计 48.88 km²(周健等, 2020)。2016 年, 渤海秦皇岛贻贝 PSTs 最高含量达 52 072.8 μg STXeq/kg, 导致 10 余人中毒及 2 人死亡(张海涛等, 2022), 其含量为欧洲食品安全局(EFSA)安全限量(800 μg STXeq/kg)的 65 倍(Alexander *et al*, 2009); 2007 年, 黄海海域虾夷扇贝 PSTs 检出率为 79.2%, 最高含量达 8 339.6 μg STXeq/kg(范礼强等, 2021)。2019—2021 年, 渤海海域唐山贝类养殖区的 7 种经济贝类检出了

PSTs, 其中, GTX1 含量最高为 537.95 μg/kg(郑旭颖, 2023)。Wu 等(2015)在我国沿海发现了 5 种 LSTs: OA、氮杂螺环毒素(azaspiracid, AZA)1、PTX2、GYM 和去甲螺旋内酯 C 毒素(13-desmethylspirolide C, SPX)1, 最高含量分别为 37.3、5.90、16.4、14.4 和 8.97 μg/kg, 其中, 山东青岛样品的 PTX2 含量最高, 为 14.4 μg/kg。Zheng 等(2022)在山东省 7 个城市采集了 133 个贝类样品用于测定 DA 含量, 超过 1/3 (36.1%)的样品检测到 DA, 含量范围为 0~102 μg/kg, 其中, 烟台 DA 平均含量为 22.0 μg/kg。

黄渤海海域已广泛存在 PSTs、LSTs、DA 及其产毒藻属藻类(Song *et al*, 2014)。长岛地处两大海域交汇处, 目前还缺乏对贝类毒素组分种类、含量、季节变化规律等方面的全面系统的研究, 对于毒素污染特征及潜在来源尚未明确(Chen N *et al*, 2023; 于仁成等, 2016b)。本研究通过在长岛对浮游植物及贝类进行连续采样, 使用 LC-MS/MS 法筛查不同基质中多种贝类毒素, 探究长岛海域中贝类毒素的种类、含量及分布特征, 了解目标海域贝类毒素的污染状况和变化规律, 以期识别目标海域贝类中毒素风险的可能来源。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 毒素标准溶液: OA、DTX1、DTX2、虾夷扇贝(yessotoxin, YTX)、AZA1、AZA2、AZA3、PTX2、GYM、SPX、DA、磺酰氨基乙酰膝沟藻毒素(N-sulfocarbamoylgonyautoxin-2&3, C1&2)、脱氨基乙酰膝沟藻毒素(decarbamoylgonyautoxin, dcGTX) 2&3、GTX2&3、GTX1&4、GTX5、脱氨基乙酰基新石房蛤毒素(decarbamoylneosaxitoxin, dcNEO)、石房蛤毒素(saxitoxin, STX)和新石房蛤毒素(neosaxitoxin, neoSTX)(加拿大国家研究所)。去离子水; 甲酸、氨水、甲酸铵、乙腈、乙酸、甲醇(质谱纯, 德国 Merck 公司)。

1.1.2 仪器 液相色谱(Shimadzu Prominence LC-20ADXR, 日本)—四极杆线性离子阱复合质谱仪(AB-5500 QTRAP, AB Sciex, 美国); 高效液相色谱(U3000)—三重四极杆质谱仪(TSQ Endura) (Thermo Scientific, 美国); HILIC 色谱柱(TSK gel Amide-80, 2.0 mm×150 mm, 5 μm, 日本东曹株式会社); Kinetex C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm, Phenomenex, 美国); X-Bridge C18 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 3.5 μm, Waters, 美国); 高速离心机(Himac CR 22G II, Hitachi, 日本); ENVI-Carb SPE 柱(3 mL, 250 mg, Supelco, 美国); Strata™-X SPE 柱(3 mL, 60 mg, Phenomenex, 美

国); Bond Elut SAX SPE 柱(3 mL, 500 mg, Agilent, 美国); 固相萃取装置(Supelco, 美国)。

1.2 样品采集

2023年6—10月期间,每月在山东烟台长岛海域的常规站位(S1、S2、S3、S4和S5)采集浮游植物1次;8月和10月在监测站位(S6和S7)采集浮游植物1次(图1)。浮游植物样品采集方法:采集表层海水5 L,其中1 L×5分别过滤到4张GF/C滤膜(孔径1.2 μm, Φ47 mm)和1张PC膜(孔径0.22 μm, Φ47 mm),4张

微孔滤膜分别用于测定PSTs/LSTs/DA/备份,PC膜样品用于测定有毒藻分子生物学相关信息,−20℃冷冻保存,并尽快转移至−80℃保存。2023年6—10月每月在长岛附近海域养殖场采集贝类样品,包括太平洋牡蛎、栉孔扇贝和紫贻贝。沉积物采集:使用抓斗式采泥器采集沉积物,采集后用软胶管吸走上腹水,将沉积物放至洁净的不锈钢样品盘中。用不锈钢勺取表层0~2 cm沉积物样品,保存在样品袋,做好标记、冷藏保存。所有样品均按地点和时间分类,保存在4℃便携式冷却箱中,并在48 h内运至实验室。

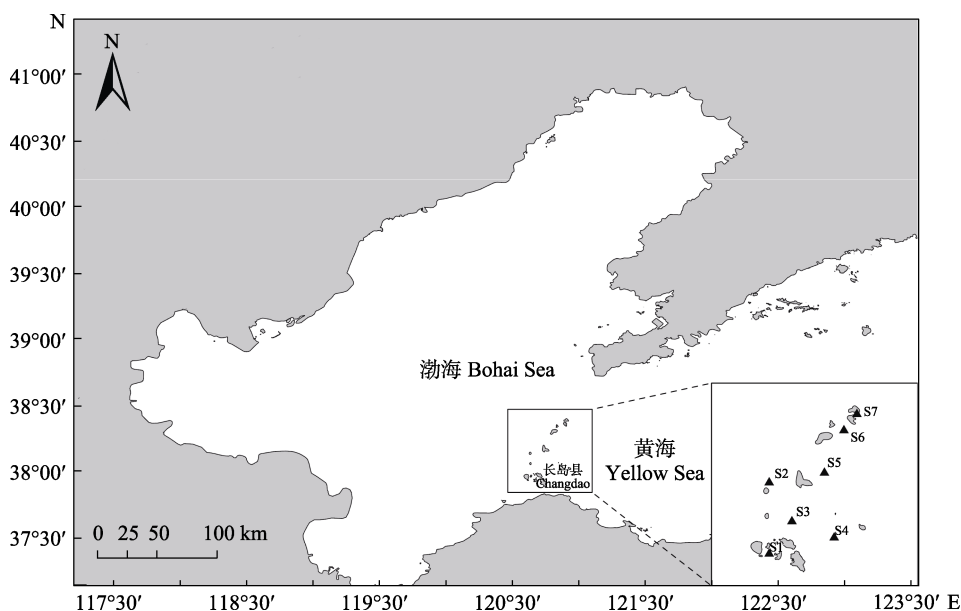


图1 长岛附近海域采样站位

Fig.1 Sampling sites in the Changdao Island

1.3 毒素提取

1.3.1 贝类 PSTs、LSTs、DA 提取 PSTs: 参考 Zheng 等(2024)的方法,使用1%乙酸提取PSTs,提取液使用 ENVI-Carb SPE 柱(3 mL, 250 mg)萃取净化,过0.22 μm水系滤膜于进样小瓶中。LSTs: 参考 Wu 等(2015)的方法,采用甲醇溶液提取LSTs,使用 Strata TM-X SPE 柱(3 mL, 60 mg)萃取提取液,定容后过0.22 μm有机系滤膜于进样小瓶中。DA: 参考 Zheng 等(2022)的方法,选择 Bond Elut SAX SPE 柱(3 mL, 500 mg)萃取提取液,定容后过0.22 μm水系滤膜于进样小瓶中。以上样品均供 LC-MS/MS 分析。

1.3.2 浮游植物 PSTs、LSTs、DA 提取 将 GF/C 滤膜剪碎放入离心管中,分别加入5 mL 1%乙酸水(提取 PSTs)/甲醇(提取 LSTs)/50%甲醇(提取 DA)溶液,冰浴超声破碎(间隔2 s,破碎5 min),取破碎完液体2 mL,10 000 r/min离心10 min,取上清液1 mL,分

别过0.22 μm水系/有机系/水系滤膜于进样小瓶中,供 LC-MS/MS 分析。

1.4 LC-MS/MS 方法与参数

PSTs: 参考 Boundy 等(2015)和 Qiu 等(2022)的方法,采用高效液相色谱-三重四极线性离子阱质谱对 PSTs 样品进行 LC-MS/MS 分析。使用 HILIC 色谱柱在40℃下分离 PSTs。LSTs: 参考 Wu 等(2015)的方法,使用 Waters X-Bridge C18 色谱柱在40℃下分离 LSTs。DA: 参考 Zheng 等(2022)的方法,使用 U3000 高效液相色谱系统和三重四极杆质谱仪进行分析。液相系统中使用 Kinetex C18 色谱柱,温度为35℃。

1.5 浮游植物高通量测序分析方法

本研究使用 S3 站位(120.72°E, 38.05°N)采集的浮游植物样品进行高通量分析,筛选长岛附近海域潜在的 PSTs 产生源。样品制备和分析方案参照 Chen 等

(2019)的方法, 使用 E.Z.N.A™ Mag Bind Soil DNA Kit (Omega, M5635-02, 美国)提取浮游样品基因组 DNA。反应设置: 微生物 DNA (10 ng/ μ L) 2 μ L; 扩增子 PCR 正向引物(10 μ mol/L) 1 μ L; 扩增子 PCR 反向引物(10 μ mol/L) 1 μ L; 2 \times Hieff® Robust PCR Master Mix (Yasen, 10105ES03, 中国)。将板密封并在热循环仪器(Applied Biosystems 9700, 美国)中使用以下程序进行 PCR: 1 个循环在 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 前 5 个循环在 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、45 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 循环 20 次。

PCR 产物使用 TBE 缓冲液(Tris、硼酸、EDTA)中的 2% (w/v)琼脂糖凝胶电泳进行检查, 用溴化乙锭(EB)染色并在紫外光下可视化。使用通用 Illumina 进行文库构建。在测序之前, 使用 Qubit® 4.0 Green 双链 DNA 测定法测定每个 PCR 产物的 DNA 浓度, 并使用生物分析仪(Agilent 2100, 美国)进行质量控制。

1.6 质量控制

实验中使用的所有容器在使用前均用甲醇和蒸馏水交替冲洗 2~3 次, 以减少潜在污染或残留效应。LC-MS/MS 分析中, 每 10 个样品插入一次试剂空白、标准溶液, 以保证结果的精密度和准确性。同时使用样品空白来验证样品在处理过程中是否存在污染。所有目标分析物的回归系数 r^2 均高于 0.995。所有目标分析物的加标回收率为 63.7%~91.3%。

1.7 数据处理

描述及统计性相关图表均使用 Origin 2023 处理生成, 使用 Usearch 软件将有效标签聚类成相似度 $\geq 97\%$ 的操作分类单元(OTU), 采样图使用 ArcGIS Pro(2022)绘制, 底图从国家地理信息公共服务平台下载, 审图号: GS(2024) 0650 号。

2 结果

对 2023 年 6—10 月在长岛附近海域采集的贝类样品、浮游植物样品进行毒素分析, 共筛查 29 种贝毒, 包括 14 种 PSTs、14 种 LSTs 以及 1 种 DA。整个调查期间检出了 PSTs 和 LSTs, 未检出 DA。其中, PSTs 的主要检出组分是 GTX1/4、GTX2/3、C1 和 C2, 而 LSTs 检出率低且含量低, 仅有 6 月栉孔扇贝样品检出 PTX2, 含量仅为 2.46 μ g PTX2eq/kg SM, 远低于欧盟现行的安全限量 160 μ g PTX2eq/kg SM (Alexander *et al*, 2009)。由于本研究中长岛附近海域贝类、浮游植物的 DA、LSTs 污染风险较低, 因此, 将重点分析 PSTs 的污染特征及潜在来源。

2.1 贝类样品中 PSTs 检出概况

表 1 列出了 6—10 月贝样中检出 PSTs 的含量、组分及检出率, 均未超过 EFSA 安全限量。检出毒素组分以 GTX2、GTX5、C1 和 C2 为主。GTX2 是检出率最高的毒素, 为 53.3%。C1 是含量最高的毒素 (179 μ g/kg)。而 GTX1 是毒性最强的毒素之一, 检出率为 30%, 最高含量为 43.4 μ g/kg。全部贝样中未检测到 STX、NEO、dcSTX、dcNEO、GTX6 等毒素。

图 2 展示了 6—10 月有检出的贝类 PSTs 含量、组分及毒性当量的变化。整个调查期间采集的贝样中, 6 月和 8 月的紫贻贝、太平洋牡蛎, 以及 7 月全部贝样未检出 PSTs。而 PSTs 毒性水平出现了 2 个峰值, 其中, 9 月栉孔扇贝毒性最高 (167 μ g STXeq/kg), 其次是 10 月栉孔扇贝 (64.5 μ g STXeq/kg)。9 月栉孔扇贝 PSTs 含量为 478 μ g/kg, 同样是所有月份中最高, 其次是 10 月栉孔扇贝, 含量为 221 μ g/kg。其他有检出的月份 PSTs 含量与毒性水平较低, 6—10 月采集的贝样 PSTs 毒性水平及含量总体呈先上升后下降趋势, 6—8 月无明显升高, 9 月增至峰值, 10 月则出现较大回落。

表 1 长岛附近海域 PSTs 检出率和含量

Tab.1 Detection rate and concentration of PSTs in the sea area near Changdao Island

毒素 Toxin	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3	dcGTX2	dcGTX3	GTX5	C1	C2	
检出率 Detection rate /%	30.0	30.0	53.3	30.0	20.0	20.0	46.6	40.0	40.0	
毒素含量 Toxin concentration /(μ g/kg)	最小值 Min	1.56	1.32	4.14	1.55	21.1	9.49	1.90	4.58	1.95
	最大值 Max	43.4	15.8	81.0	19.3	67.2	18.3	30.3	179.0	22.7
	中位数 Median	2.77	2.83	10.8	2.12	44.20	13.90	2.38	18.90	3.25
	偏度 Skewness	1.17	0.72	1.80	0.62	2.44	1.52	0.54	1.76	1.62
	峰度 Kurtosis	-0.12	-2.09	3.56	-3.25	6.07	2.45	-0.45	2.85	1.96

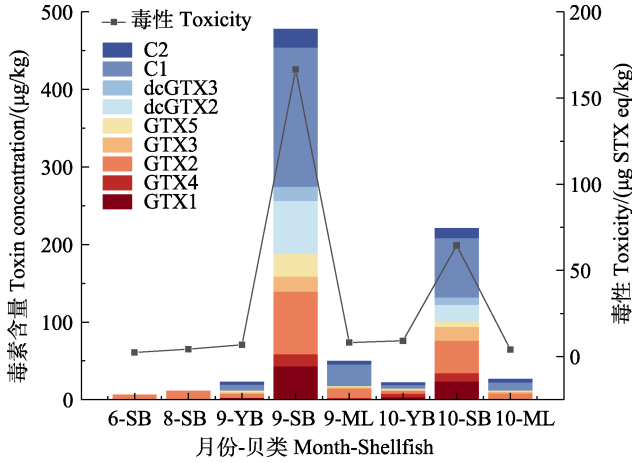


图 2 不同月份贝类 PSTs 含量及毒性当量
Fig.2 Concentration and toxic equivalency of PSTs in shellfish samples in different months

SB: 栉孔扇贝; YB: 紫贻贝; ML: 太平洋牡蛎。
SB: *Chlamys farreri*; YB: *Mytilus galloprovincialis*;
ML: *Crassostrea gigas*.

不同月份检出的 PSTs 组分有所差异(图 3), 6 月和 8 月检出了氨基甲酸酯类的 GTX2 和 GTX3, 分别

占比 73.0%、27.0%与 69.9%、30.1%。9 月共检出 9 种组分, 其中, N-磺胺甲酰基类的 C1 占比 39.1%, 为 9 月含量最高组分; 其次是 GTX2, 占比 17.9%; 脱氨甲酰基类的 dcGTX2 占比 12.2%, 含量较少的是几种 β 差向异构体如 C2、dcGTX3、GTX3 和 GTX4, 分别占比 5.20%、3.30%、4.10%和 3.10%。10 月检出组分及占比和 9 月相似, 但不同组分含量上有所差异。

2.2 浮游植物样品中 PSTs 检出概况

2023 年 6—10 月在长岛附近海域 7 个站位采集了浮游植物样品, 其中, 9 月 S2、S3 和 S4 站位采集样品有 PSTs 检出, 10 月 S1 和 S2 站位有检出, 且含量较低。其他月份及站位均未检出 PSTs。浮游植物 PSTs 最高含量为 9 月 S2 站位的 21.51 ng/L, 平均含量为 21.09 ng/L。10 月 PSTs 平均含量为 2.26 ng/L (图 4)。10 月 S1 和 S2 站位仅检出 2 种组分, 分别为 dcGTX3 和 GTX4。相比于 10 月, 9 月 PSTs 组分较为丰富, 共检出 7 种组分(图 4), 分别为 GTX1/4、GTX2、dcGTX3、GTX5 和 C1/2, 且 3 个检出站位组分差异较小。

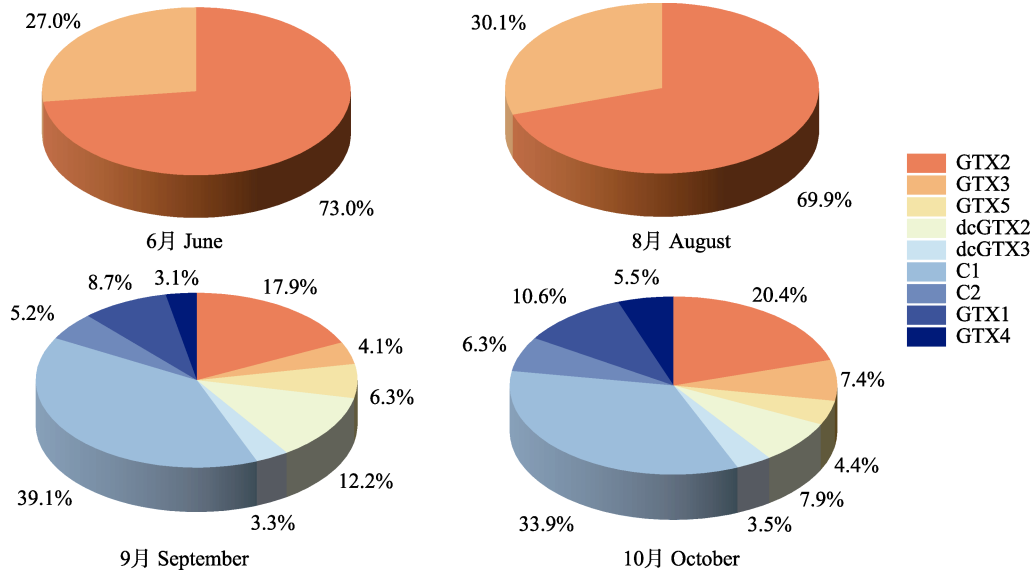


图 3 不同月份贝类 PSTs 组分占比
Fig.3 The proportion of PSTs components in shellfish in different months

2.3 PSTs 潜在产毒藻物种鉴定

本研究选用 S3 站位(120.72°E, 38.05°N)浮游植物样品的高通量测序数据来检索位于黄渤海交界处的长岛附近海域可能存在的 PSTs 产毒藻种类。使用 Illumina MiSeq 系统进行测序。测序后, 通过 PEAR 软件根据重叠情况组装 2 个短 Illumina 读数, 并处理

fastq 文件, 生成单独的 fasta 和 qual 文件, 通过标准方法进行分析。使用 Usearch 软件将有效标签聚类成相似度 ≥97% OTU。去除嵌合序列和单例 OTU, 然后根据 OTU 将剩余序列分类到每个样本中。选择丰度最高的标签序列作为每个簇内的代表序列。通过分别针对 NCBI 数据库、RDP 数据库和 UNITE 真菌 ITS 数据库进行检索, 对细菌和真菌 OTU 代表序列进行

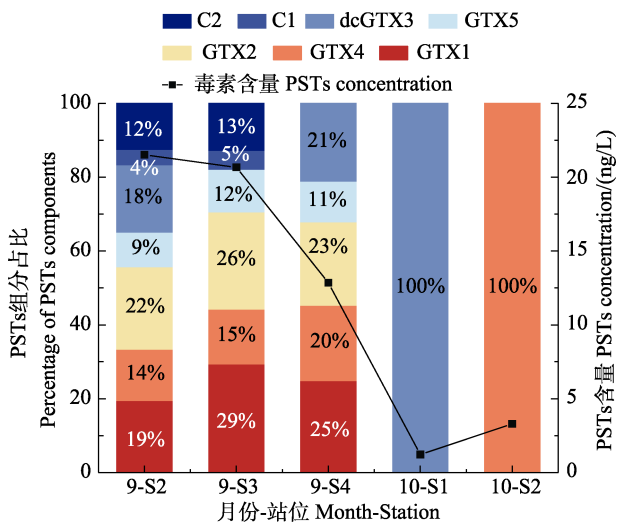


图 4 不同月份浮游植物 PSTs 组分占比及含量
Fig.4 The percentage and concentration of PSTs components in phytoplankton in different months

分类。根据长岛附近海域浮游植物样品高通量测序结果, 共有 2 012 个 OTU 被归属为真核微藻, 经与数据库的 BLASTing 结果对比, 筛选出 8 个可能属于亚历山大属藻类的 OTU。

6—10 月检测的 5 个浮游植物样品藻丰度如图 5 所示, 7—10 月均有亚历山大属细胞检出, 其中, 9 月亚历山大属细胞与其余月份相比丰度最高。对 9 月 S3 站点采集的沉积物样品进行甲藻包裹分析鉴定, 也发现亚历山大属细胞包裹(图 6), 表明本研究采样的长岛海域可能存在一定的亚历山大属藻类危害。

3 讨论

3.1 长岛附近海域贝类 PSTs 污染特征

黄渤海地区赤潮灾害发生较为频繁, 2023 年黄渤海海域共发生 15 次赤潮灾害, 累计受灾面积达 426 km² (自然资源部海洋预警监测司, 2024)。李晓康等(2024)检测了 2022 年 3—6 月渤海秦皇岛地区部分经济贝类的 PSTs 含量, 其中最高毒性当量为 728.1 μg STXeq/kg, 主要检出组分为 GTX1/4、GTX2/3 和 C1, 其中, 北戴河地区的 PSTs 污染程度最严重。Cao 等(2023)研究分析了 2019—2020 年大连地区黄渤海贝类中 PSTs 污染状况, 栉孔扇贝 PSTs 检出率高达 94.4%, 其最高检出量为 3 953.5 μg STX·2HCl eq/kg, 主要检出组分为 GTX1、C1 和 dcNEO。范礼强等(2021)检测了黄海海域虾夷扇贝 PSTs 污染情况, 其检出率为 79.4%, 最高检出含量为 8 339.6 μg STX eq/kg, 远高于 PSTs 安全限量(800 μg STXeq/kg)。2019 年, 在

渤海海域采集的紫贻贝、虾夷扇贝 PSTs 检出率为 61.1%, 最高检出含量为 288.5 μg STXeq/kg, 而在黄海海域采集的长牡蛎最高含量为 526.9 μg STXeq/kg (张海涛, 2022)。与黄渤海其他附近海域相比, 本研究分析的长岛附近海域贝类 PSTs 主要检出组分基本一致, 但含量较低; 主要组分为 GTX1/4、GTX2/3、C1/C2、dcGTX2/3 等, 不含 STX 和 NEO 等毒性当量较高的组分。

3.2 长岛附近海域浮游植物 PSTs 污染来源及特征

选择高通量扩增的 V4 靶区, 从 NCBI 下载了 12 个亚历山大属的 18S rDNA V4 区序列, 结合本研究中筛选的亚历山大属藻 OTU 序列, 采用 MEGA 11 最大似然法构建系统进化树(图 7), 对部分亚历山大属藻类进行了种系进化关系分析。OTU1735、OTU1463、OTU1776、OTU290 和 OTU436 其对应种的同一性很高(>99%), 这些 OTU 有可能代表对应的亚历山大属藻类。其他 OTU818 与 OTU93 其对应物种的同一性较低(91%~97%), 但利用 18S rDNA V4 区域序列构建的最大似然树仍支持其归属。而在可能检出的亚历山大属藻类中, 太平洋亚历山大藻(*A. pacificum*)、近缘亚历山大藻(*A. affine*)在整个采样期间(6—10 月)都持续存在, 而微小亚历山大藻(*A. minutum*)、李氏亚历山大藻(*A. leei*)仅在 9 月和 10 月检出, 其余几种丰度较低。值得注意的是, DNA 提取及目标序列扩增偏好性对高通量测序结果影响很大, 如果采用 qPCR 方法可能会得到更加可靠的结果。因此, 基于 V4 丰度对 PSTs 的指示意义值得进一步关注(孙洪潇等, 2023)。

渤海海域发现了亚历山大属藻的营养细胞和包裹, 并有亚历山大属赤潮灾害的报道(Liu *et al.*, 2017)。Min 等(2023)在山东近海海域检出链状亚历山大藻(*A. catenella*)、太平洋亚历山大藻、近缘亚历山大藻等亚历山大属藻细胞, 其中, 太平洋亚历山大藻在夏季检出。Gao 等(2015)研究发现黄海海域存在塔玛亚历山大藻、芬地亚历山大藻(*A. fundyense*)和太平洋亚历山大藻, 其中, 芬地亚历山大藻、太平洋亚历山大藻会产生较多的 C1/2、GTX1/4、GTX2/3、GTX5、dcGTX2/3 等毒素。根据其他研究分析, 近缘亚历山大藻、微小亚历山大藻会产生 GTX1/4、GTX2/3 (Liu *et al.*, 2020), *A. leii* 会产生 GTX5、GTX1/4、GTX2/3 (Nguyen-Ngoc, 2004)。这些研究与本研究检出的藻属、毒素组分及其出现的月份基本对应, 因此, 推测本研究分析的长岛附近海域 PSTs 产毒藻可能为亚历

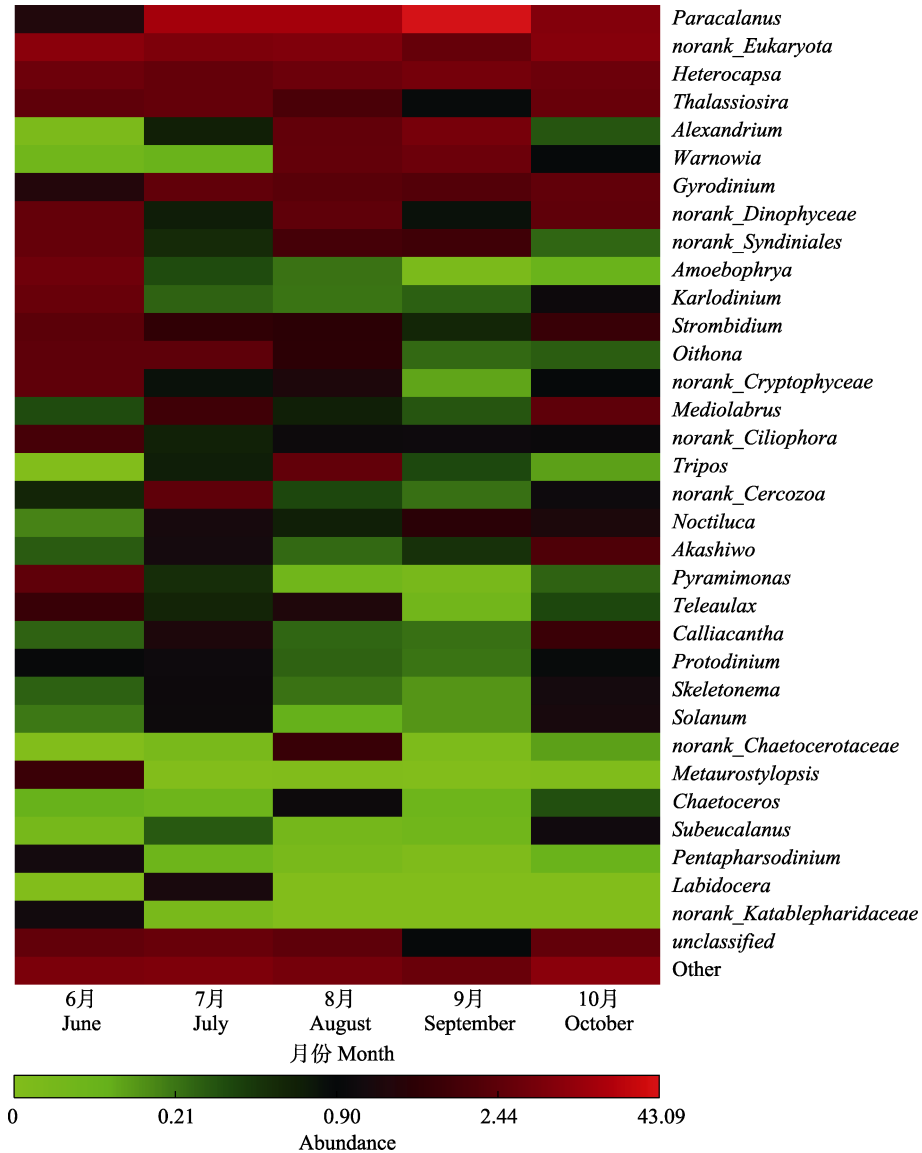


图 5 长岛附近海域 S2 站位 6—10 月浮游植物丰度对比

Fig.5 Comparison of phytoplankton abundance from June to October in the sea area near Changdao Island at S2 station

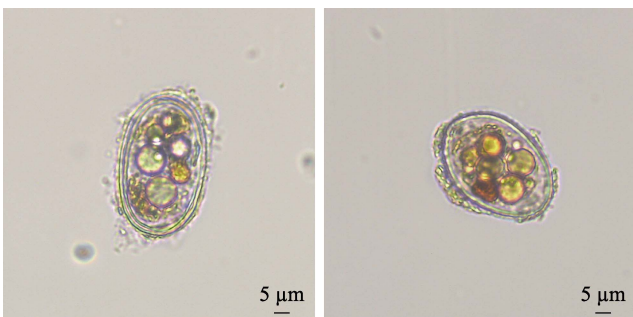


图 6 亚历山大属细胞包裹光学显微镜照片

Fig.6 Optical microscope photograph of cellular encapsulation of *Alexandrium* spp.

山大属藻类。长岛 6—10 月贝类样品中平均 PSTs 含量存在差异，9 月的贝类样品平均 PSTs 含量最高。Alonso 等(2024)研究发现，亚历山大属藻在生长动力

学和温度测试中呈正相关关系，21~27 °C 区间较为适合其生长，最佳温度区间为(25±2) °C。Nguyen-Ngoc (2004)研究发现，近缘亚历山大藻的生长温度范围为 21~27 °C，在 21~24 °C 时达到生长指数期；塔玛亚历山大藻生长率随温度变化显著，低于 7 °C 或高于 26 °C 时不生长，最适生长范围为 11~22 °C。Suka 等 (2024)研究发现，在自然环境中，李氏亚历山大藻适合在约 20 °C 生长，而链状亚历山大藻适合在约 10 °C 下生长。根据中国近海海洋气候检测月报数据显示，2023 年 9 月渤海海域月平均海温为 21.5~23.0 °C；黄海海域月平均海温为 21.5~26.0 °C，其中，靠近长岛附近海域平均海温为 21.5~23.0 °C，适宜部分亚历山大藻类繁殖。结合高通量测序结果，本研究中长岛附近海域 PSTs 存在的产毒藻可能为近缘亚历山大藻、

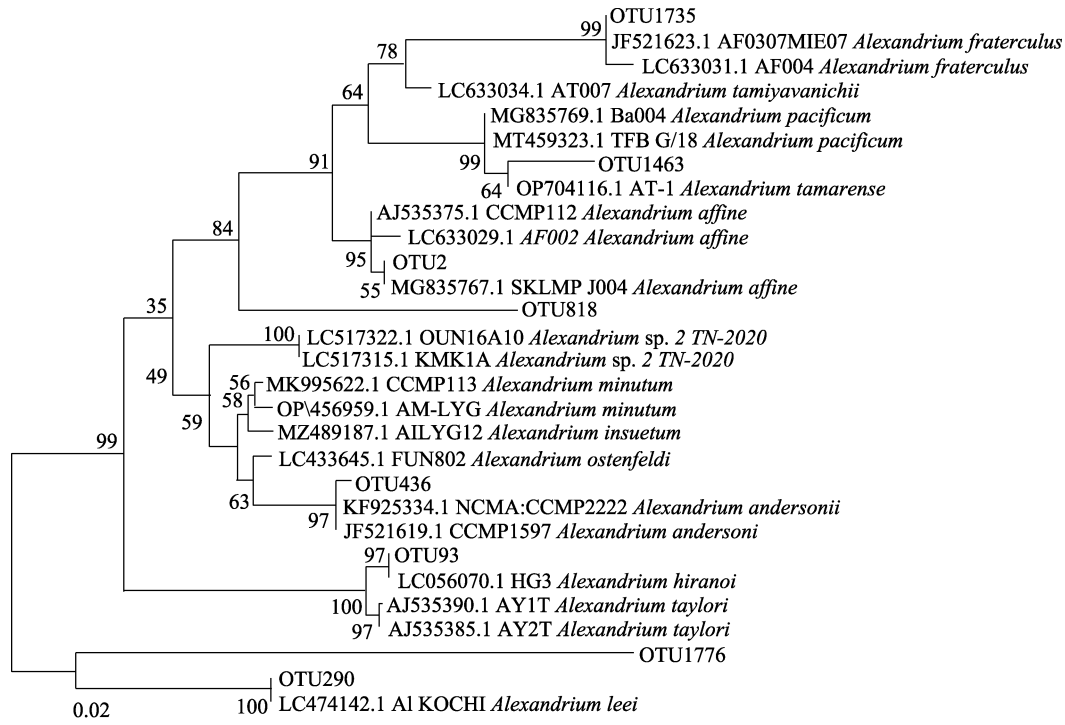


图 7 基于 18S rRNA 基因 V4 区序列分析的常见亚历山大藻种系统进化树(最大似然法)

Fig.7 Phylogenetic tree of common *Alexandrium* spp. based on sequence analysis of the V4 region of the 18S rRNA gene (maximum likelihood method)

太平洋亚历山大藻、微小亚历山大藻、李氏亚历山大藻等亚历山大属藻类。

此外,本研究还发现浮游植物与贝类 PSTs 组分存在差异,其中, GTX1/4、GTX2/3、C1/2 差异较为显著。研究表明,贝类体内的谷胱甘肽和半胱氨酸等可将氨基甲酸酯类衍生物发生相互转化, Andres 等(2019)进行的微小亚历山大藻暴露贻贝实验中发现, GTX1/4 经还原反应向 GTX2/3 转化。Ding 等(2017)研究表明,贝类体内的 C1/2 能够转化为 GTX2/3,从而使低毒性的 N-磺酰氨基甲酰基类毒素转化为高毒性的氨基甲酸酯类毒素。差向异构化是双壳贝类组织中最常见的生物转化。本研究中浮游植物 PSTs 组分比贝类组分少,未检出 β 态差向异构体 GTX3 和 α 态差向异构体 dcGTX2,可能是在贝类体内 α 与 β 态差向异构体发生了一定比例的相互转化(Leal *et al.*, 2022)。而毒素组分差异的原因不仅是 PSTs 在贝类体内发生生物转化,水体中可能存在其他毒素组分,经贝类滤食后进入贝类体内,从而导致贝类 PSTs 组分与浮游植物中组分的差异(Chen *et al.*, 2023)。

4 总结与展望

本研究通过对 2023 年 6—10 月长岛附近海域贝类、浮游植物中 PSTs、LSTs 和 DA 的调查,发现 LSTs

和 DA 含量、检出率低,污染风险较低。6—10 月 PSTs 含量大体呈上升趋势,其中,9 月平均 PSTs 含量最高,不同品种中栉孔扇贝 PSTs 含量最高,不同站点中 S2 采集的浮游植物 PSTs 含量最高。进一步对浮游植物进行高通量分析后发现,其中可能存在 8 种亚历山大藻属藻类,9 月亚历山大藻属藻类丰度最高,且在 9 月沉积物样品中发现了亚历山大藻属藻类包裹,结合相关文献(Min *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2015)推测本研究中长岛海域 PSTs 产毒藻可能为亚历山大藻属藻类。虽然本研究调查的贝类、浮游植物的 PSTs、LSTs 和 DA 毒素水平远低于安全限量,但应持续监测毒素的发生情况,以便对长岛近海海域水产养殖区的毒素污染提供早期预警,保障水产品质量安全。

参 考 文 献

- ALEXANDER J, BENFORD D, COCKBURN A, *et al.* Marine biotoxins in shellfish: Summary on regulated marine biotoxins. *EFSA Journal*, 2009, 1306: 1–23
- ALONSO-RODRÍGUEZ R, PICHARDO-VELARDE J G. Effects of temperature and nutrients on growth and toxicity of *Alexandrium affine* from southeastern Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 2024, 203: 116464
- ANDRES J K, YÑIGUEZ A T, MAISTER J M, *et al.* Paralytic shellfish toxin uptake, assimilation, depuration, and

- transformation in the southeast asian green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Toxins*, 2019, 11(8): 468
- BOUNDY M J, SELWOOD A I, HARWOOD D T, *et al.* Development of a sensitive and selective liquid chromatography-mass spectrometry method for high throughput analysis of paralytic shellfish toxins using graphitised carbon solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1387: 1–12
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. *China fishery statistical yearbook 2024*. Beijing: China Agriculture Press, 2024 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2024]
- CAO Y D, QIU J B, LI A F, *et al.* Occurrence and spatial distribution of paralytic shellfish toxins in seawater and marine organisms in the coastal waters of Qinhuangdao, China. *Chemosphere*, 2023, 315: 137746
- CHEN J H, HAN T Z, LI X T, *et al.* Occurrence and distribution of marine natural organic pollutants: Lipophilic marine algal toxins in the Yellow Sea and the Bohai Sea, China. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 931–939
- CHEN J H, YANG J B, HE X P, *et al.* Prevalence of the neurotoxin domoic acid in the aquatic environments of the Bohai and Northern Yellow seas in China. *Science of the Total Environment*, 2023, 876: 162732
- CHEN N S, DING X X, CUI Z M. Advances in the study of red tide species biodiversity around Shandong Peninsula. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2023, 54(5): 1259–1273
- CHEN Z F, ZHANG Q Z, KONG F Z, *et al.* Resolving phytoplankton taxa based on high-throughput sequencing during brown tides in the Bohai Sea, China. *Harmful Algae*, 2019, 84: 127–138
- DING L, QIU J B, LI A F. Proposed biotransformation pathways for new metabolites of paralytic shellfish toxins based on field and experimental mussel samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(27): 5494–5502
- FAN L Q, ZHENG G C, WU H Y, *et al.* Research progress on the accumulation and metabolism of paralytic shellfish toxin in mussels. *Marine Sciences*, 2021, 45(4): 201–211 [范礼强, 郑关超, 吴海燕, 等. 贻贝对麻痹性贝类毒素的蓄积代谢研究进展. *海洋科学*, 2021, 45(4): 201–211]
- GAO Y, YU R, MURRAY S A, *et al.* High specificity of a quantitative PCR assay targeting a saxitoxin gene for monitoring toxic algae associated with paralytic shellfish toxins in the Yellow Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(20): 6973–6981
- JIN X S, TIAN H L, SHAN X J. Development and prospects of studies on inshore fisheries resources in China. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(11): 120–129 [金显仕, 田洪林, 单秀娟. 我国近海渔业资源研究历程及展望. *水产学报*, 2023, 47(11): 120–129]
- LEAL J F, CRISTIANO M L S. Marine paralytic shellfish toxins: chemical properties, mode of action, newer analogues, and structure-toxicity relationship. *Natural Product Reports*. 2022, 39(1): 33–57
- LI Q L, XIA B, SUI Q, *et al.* Heavy metal pollution and risk assessment in different species of fish from the Bohai Sea. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(2): 39–49 [李奇龙, 夏斌, 隋琪, 等. 渤海渔业生物重金属污染及风险评估. *渔业科学进展*, 2024, 45(2): 39–49]
- LI X K, WU H Y, CHENG L, *et al.* Pollution characteristics and risk assessment of paralytic shellfish toxins in shellfish from Hebei coastal waters. *Progress in Fishery Sciences*, 2024, 45(4): 195–204 [李晓康, 吴海燕, 程玲, 等. 河北省近岸贝类中麻痹性贝毒污染特征及风险评估. *渔业科学进展*, 2024, 45(4): 195–204]
- LIU L J, CHEN J H, HE X P, *et al.* First determination of extracellular paralytic shellfish poisoning toxins in the culture medium of toxigenic dinoflagellates by HILIC-HRMS. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 204: 111042
- LIU Y, YU R C, KONG F Z, *et al.* Paralytic shellfish toxins in phytoplankton and shellfish samples collected from the Bohai Sea, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 115(1/2): 324–331
- MIN J, KIM K Y. Seasonal change and subniche dynamics of three *Alexandrium* species in the Korea Strait. *Harmful Algae*, 2023, 125: 102420
- Ministry of Natural Resources. *China's ocean disaster report (2023)*. Beijing: China Ocean Press, 2024 [自然资源部. 中国海洋灾害公报(2023). 北京: 海洋出版社, 2024]
- NGUYEN-NGOC L. An autecological study of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium affine* isolated from Vietnamese waters. *Harmful Algae*, 2004, 3(2): 117–129
- QIU J B, ZHANG L, CAO Y D, *et al.* Bioaccessibility of paralytic shellfish toxins in different cooked shellfish using the simulated digestive model. *Food Chemistry*, 2022, 390: 133094
- SONG L, SONG G J, SONG Y G, *et al.* Toxic algae and early warning management in Yellow Sea and Bohai Sea of China. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2014, 6(2): 83–86
- SUKA A, SHIKATA T, YUASA K, *et al.* The toxigenic red-tide-forming dinoflagellates *Alexandrium leei* and *Alexandrium catenella* differ in terms of the sensitivity to strong light and low temperature of their photosynthetic machinery. *Algal Research*, 2024, 79: 103495
- SUN H X, TANG W J, LIU C, *et al.* Contamination status and origins of lipophilic marine toxins in Qinhuangdao coastal waters. *Marine Science*, 2023, 47(3): 41–48 [孙洪潇, 唐文娇, 刘超, 等. 秦皇岛近岸海域脂溶性藻毒素污染状况与来源分析. *海洋科学*, 2023, 47(3): 41–48]
- TANG W J, LIN Z R, ZHANG Q C, *et al.* An investigation on bloom dynamics of *Alexandrium catenella* and *A. pacificum* and toxin accumulation in shellfish along the coast of

- Qinhuangdao, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2022, 183: 114058
- WU H Y, YAO J H, GUO M M, *et al.* Distribution of marine lipophilic toxins in shellfish products collected from the Chinese market. *Marine Drugs*, 2015, 13(7): 4281–4295
- YAN Z, KAMANMALEK S, ALAMDARI N. Predicting coastal harmful algal blooms using integrated data-driven analysis of environmental factors. *Science of the Total Environment*, 2024, 912: 169253
- YU R C, LIU D Y. Harmful algal blooms in the coastal waters of China: Current situation, long-term changes and prevention strategies. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2016a, 31(10): 1167–1174 [于仁成, 刘东艳. 我国近海藻华灾害现状、演变趋势与应对策略. *中国科学院院刊*, 2016a, 31(10): 1167–1174]
- YU R C, LUO X. Status and research perspectives on toxic algae and phycotoxins in the coastal waters of China. *Studia Marina Sinica*, 2016b, 51(1):155–166 [于仁成, 罗璇. 我国近海有毒藻和藻毒素的研究现状与展望. *海洋科学集刊*, 2016b, 51(1): 155–166]
- ZHANG H T. Studies on the source apportionment and damage mechanism of paralytic shellfish toxins in *Mytilus galloprovincialis* from the Bohai Sea. Master's Thesis of Ocean University of Jiangsu, 2022 [张海涛. 渤海贻贝中麻痹性贝类毒素来源解析、危害形成机制研究. *江苏海洋大学硕士学位论文*, 2022]
- ZHAO J, ZHAO B, KONG N, *et al.* Water stratification alters phytoplankton assemblages in scallop farming waters of the North Yellow Sea in China. *Marine Environmental Research*, 2024, 196: 106399
- ZHENG G C, CHE H Y, WU H Y, *et al.* Risk characteristics of shellfish toxins in *Mytilus unguiculatus* around the Zhoushan Islands, East China Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2024, 199: 115955
- ZHENG G C, WU H Y, GUO M M, *et al.* First observation of domoic acid and its isomers in shellfish samples from Shandong Province, China. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2022, 40(6): 2231–2241
- ZHENG X Y, LI Z X, SUN X J, *et al.* Surveillance and risk assessment of diarrhetic and paralytic shellfish toxins in the Tangshan shellfish culture areas of Bohai Sea, China. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(5): 231–241 [郑旭颖, 李兆新, 孙晓杰, 等. 渤海海域唐山贝类养殖区腹泻性和麻痹性贝类毒素的监测与风险评估. *渔业科学进展*, 2023, 44(5): 231–241]
- ZHOU J, WANG W, WU Z H, *et al.* The basic characteristics and prevention countermeasures of red tide in Shandong coast waters. *Marine Environmental Science*, 2020, 39(4): 537–543 [周健, 王玮, 吴志宏, 等. 山东沿海赤潮灾害基本特征及防控对策建议. *海洋环境科学*, 2020, 39(4): 537–543]

(编辑 冯小花)

Pollution Characteristics and Potential Sources of Shellfish Toxins in Summer and Autumn in the Sea Area near Changdao Island

DENG Yuxiang^{1,2}, CHENG Ling³, WU Haiyan², YUAN Chengxu⁴, TAN Zhijun^{2,5}, ZHENG Guanchao^{2①}

(1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 4. Marine Ecological Civilization Comprehensive Experimental Area of Changdao, Yantai 265800, China; 5. State Key Laboratory of Mariculture Biobreeding and Sustainable Goods, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract From 1990 to 2020, red tides of *Alexandrium tamarense*—which produces paralytic shellfish toxins (PSTs)—were monitored in the waters of the Nanhuangcheng Island Sea area in Changdao County, China, with a cumulative affected area of 2.37 km². PST-producing *Gymnodinium* spp. were also detected in the Yantai Sishili Bay and Weihai coastal waters, with a cumulative affected area of 48.88 km². In 2020, lipophilic shellfish toxin (LST)-producing *Dinophysis* spp. were detected in the North Yellow Sea. In 2021, amnesic shellfish toxin (AST)-producing *Pseudo-nitzschia* was detected in small quantities

① Corresponding author: ZHENG Guanchao, Email: zhenggc@ysfri.ac.cn

in the typical *Patinopecten yessoensis* culture area of Zhangzi Island and Yantai Sishili Bay in the North Yellow Sea. PSTs, LSTs, ASTs, and their toxin-producing algae are widely found in the Yellow and Bohai seas.

Shellfish and phytoplankton samples were collected from waters off Changdao Island from June to October 2023, and screened for 29 shellfish toxins, including 14 PSTs, 14 LSTs, and domoic acid (DA). PSTs and LSTs were detected throughout the survey period, whereas DA was not. The main detected components of PSTs were GTX1, GTX2/3, C1, and C2, while LSTs were detected less frequently and at low concentration, and PTX2 was detected only in the *Chlamys farreri* sample of June (2.46 μg PTX2eq./kg SM), which is much lower than the current EU safety limit of 160 μg PTX2eq./kg SM. As the risks of DA and LSTs in the sea area around Changdao Island were low in this study, we focused on analyzing the pollution characteristics and potential sources of PSTs. None of the PSTs detected in the shellfish samples from June to October exceeded the EFSA safety limits. The GTX2, GTX5, C1, and C2 of PST components were detected, with GTX2 being the highest detection rate of 53.3 %, and C1 being the maximum concentration of 179 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Among the shellfish samples collected during the entire survey period, PSTs were not detected in *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* in June and August, and in all shellfish samples collected in July. PSTs were detected in *Chlamys farreri* in September at 478 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the highest concentration among all the months, followed by *Chlamys farreri* in October at 221 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Among the phytoplankton samples, PSTs were detected at stations S2, S3, and S4 in September and at stations S1 and S2 in October, with relatively low concentrations of PSTs. PSTs were not detected in other months or stations. The highest level of PSTs in phytoplankton was 23.92 $\mu\text{g}/\text{L}$ at station S2 in September, and the average level was 20.7 $\mu\text{g}/\text{L}$. The average PST level in October was 2.67 $\mu\text{g}/\text{L}$. In October, only two components were detected at stations S1 and S2—dcGTX3 and GTX4. In September, PSTs were more abundant, with seven components: GTX1/4, GTX2, dcGTX3, GTX5, and C1/2. High-throughput analysis of phytoplankton revealed the presence of eight *Alexandrium* spp. with the highest abundance of *Alexandrium* spp. in September. *Alexandrium* spp. cysts were found in the sediments in September, which suggests that the toxicity-producing algae of PSTs in the Changdao Island waters in the present study may be *Alexandrium* spp.

Although PST concentrations in the samples off Changdao Island were relatively low compared to other regions in the Yellow Sea and Bohai Sea, there is still a potential risk of PST contamination. To guarantee the quality and safety of aquatic products, monitoring of shellfish toxins should be strengthened to provide basic data for the early warning of toxin contamination in aquaculture areas.

Key words Shellfish toxins; Changdao Island; Pollution characteristics; Potential source