

文章编号: 1674-5566(2025)05-1069-11

DOI: 10.12024/jso.20240904633

## 产毒塔玛亚历山大藻对厚壳贻贝幼贝存活、抗氧化和代谢酶活性的影响

张颖<sup>1</sup>, 蔡春尔<sup>1,2</sup>, 王婧一<sup>1</sup>, 贾睿<sup>1,2</sup>, 张迪<sup>1</sup>, 何培民<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 海洋科学与生态环境学院, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水域环境生态上海高校工程研究中心, 上海 201306)

**摘要:** 为评估产毒赤潮藻塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 对厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 幼贝的生态风险, 选取平均壳长为 (18.40±2.04) mm 的厚壳贻贝幼贝, 探讨了分别暴露于塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液 12 d 内, 幼贝死亡率、组织抗氧化和代谢相关酶活性的变化。实验设置对照组、藻原液组和无细胞滤液组 3 个组别, 每隔 48 h 记录幼贝死亡情况, 每隔 96 h 分别测定幼贝软体部超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷丙转氨酶 (GPT)、碱性磷酸酶 (AKP) 及乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性。结果显示, 12 d 时藻原液组和无细胞滤液组幼贝的校正累计死亡率分别为 33.73% 和 15.66%。各处理组间的酶活性变化趋势存在差异, 其中藻原液组幼贝的 SOD、CAT、AKP 和 AChE 活性总体呈上升趋势, 而 GPT 活性先下降后升高; 无细胞滤液组幼贝的 AKP 活性比较稳定, 但连续暴露 8 d 时, SOD 和 AChE 活性呈下降趋势, GPT 和 CAT 则呈上升趋势, 12 d 时 SOD 和 CAT 活性下降, 而 GPT 和 AChE 活性升高。第 12 天时, 藻原液组幼贝 5 种酶的活性均显著高于对照组。主成分分析 (PCA) 表明, 各生理指标间均呈正相关; 综合生物标志物响应 (IBR) 指数法分析结果显示藻原液组 IBR 值与对照组差异较大, 表明塔玛亚历山大藻原液对幼贝具有较高的毒性效应。研究表明, 高于赤潮基准密度的塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液均会对厚壳贻贝幼贝的生存产生胁迫, 诱导贻贝氧化应激反应, 暴露初期抑制幼贝代谢功能。本研究为有毒赤潮爆发期间厚壳贻贝开展科学养殖提供参考。

**关键词:** 厚壳贻贝; 塔玛亚历山大藻; 幼贝; 抗氧化酶; 代谢酶; 麻痹性贝毒

**中图分类号:** S 968.3; X 55      **文献标志码:** A

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 隶属软体动物门 (Mollusca) 双壳纲 (Bivalvia) 贻贝目 (Mytiloida) 贻贝科 (Mytilidae), 是我国重要的经济贝类之一。当受到环境胁迫时, 水生生物体内会发生明显的生理生化响应<sup>[1-2]</sup>, 其中抗氧化酶和代谢相关酶常作为生物标志物, 用于评估生物体对环境刺激作出的应激反应<sup>[3-4]</sup>。KHAN 等<sup>[4]</sup>研究发现酸化、低氧和高温联合胁迫会诱导厚壳贻贝鳃组织超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性, 并影响碱性磷酸酶 (AKP) 和谷丙转氨酶 (GPT) 活性。乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性是判断神经元功能是否受损的常见指标, 诸多

研究表明海洋无脊椎动物的 AChE 活性会受到环境胁迫因子的影响<sup>[5]</sup>。过去 50 年间, 生物或非生物因素导致双壳类动物数量减少约 40 %<sup>[6]</sup>, 其中有害藻华与其大规模死亡有关, 造成重大生态和经济影响。

塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 是一种能产生麻痹性贝类毒素 (Paralytic shellfish toxins, PSTs) 的典型有害赤潮藻种, 在世界范围内广泛分布。PSTs 会在贝类体内蓄积并随着食物链传递, 威胁人类的生命安全。贝类不仅具有中间媒介的作用, 而且有毒藻会对贝类的行为<sup>[7]</sup>、抗氧化系统<sup>[8]</sup>和摄食<sup>[9]</sup>等方面产生影

收稿日期: 2024-09-12      修回日期: 2025-01-13

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2601303)

作者简介: 张颖(2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为产毒赤潮藻的毒性效应。E-mail: maggie\_3026@163.com

通信作者: 蔡春尔, E-mail: cecai@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

响。我国赤潮高发期与厚壳贻贝幼贝养殖的关键时期高度重合,且贝类对环境胁迫因子的敏感性会受到个体大小的影响,幼贝对刺激的响应通常比成贝更加敏感<sup>[10]</sup>。但目前关于亚历山大藻属对贝类毒性效应的研究主要集中在成贝,对幼贝生理活性的影响知之甚少。

除PSTs外,亚历山大藻属还可以产生许多不同类型的有毒或有害生物活性化合物,包括螺环内酯毒素(spirolides)、环亚胺毒素(gymnodimines)、goniodomins及尚未表征的生物活性细胞外化合物(BECs)<sup>[11]</sup>。PSTs不易通过完整的细胞释放到周围介质,而BECs能够被释放到细胞外,对生物体产生不利影响<sup>[12]</sup>。由于BECs很大程度上是尚未表征的化合物,目前常见的检测方法是使用微藻培养物的上清液、无细胞滤液或细胞提取物进行生物测定<sup>[13]</sup>。FORD等<sup>[12]</sup>发现塔玛亚历山大藻的无细胞滤液会抑制菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)和砂海螂(*Mya arenaria*)血细胞的粘附和吞噬作用。然而,厚壳贻贝作为海洋环境研究中广泛应用的模式生物之一,迄今为止尚未有关于塔玛亚历山大藻产生的BECs对其幼贝影响的报道。

因此,本研究通过分析塔玛亚历山大藻原液及无细胞滤液对厚壳贻贝幼贝的存活、抗氧化酶和代谢相关酶活性的影响,探讨塔玛亚历山大藻对贝类可能的危害机制,以期为赤潮爆发期间贻贝的科学养殖提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验生物

实验所用塔玛亚历山大藻(*A. tamarensense*)GY-H31购自上海光语生物科技有限公司,采用f/2培养基。培养条件为:温度(25±1)℃,盐度30±

1,光照强度40 μmol/(m<sup>2</sup>·s),光暗比(L:D)为12 h:12 h。

厚壳贻贝(*M. coruscus*)苗种于2023年10月采自浙江省舟山市嵊泗县枸杞岛(122°45' E, 30°42' N),暂养于20 L的玻璃水槽中。驯养期间每日换水并投喂小球藻(*Chlorella vulgaris*)1次。养殖用海水用浓缩盐卤配制,盐度25±1,温度(12.5±0.5)℃。实验前随机抽取30只厚壳贻贝,用游标卡尺测量体框特征,并用万分之一天平测定湿质量。其平均壳长(18.40±2.04) mm,壳宽(8.70±1.86) mm,壳高(3.64±0.72) mm,湿质量(0.287 2±0.007 1) g。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 塔玛亚历山大藻的预处理

塔玛亚历山大藻原液即培养液,第0(实验起始)、4和8天时藻原液密度分别为7 743、8 388和12 258 cells/mL;将藻密度相同的培养液经0.45 μm纤维素滤膜抽滤后得到塔玛亚历山大藻无细胞滤液。实验前取指数生长期的塔玛亚历山大藻培养液,用浮游生物计数框计数。

#### 1.2.2 实验设计

实验容器为1 L的烧杯,养殖水体积为500 mL。实验设置对照组、藻原液组和无细胞滤液组3个组别,分别记为A、B、C。每组分别设置3个平行,每个平行随机投放大小均一、健康的厚壳贻贝30只。各组实验水体配制见表1,对照组仅投喂小球藻,藻原液组投喂塔玛亚历山大藻原液及等量的小球藻,无细胞滤液组加入塔玛亚历山大藻无细胞滤液及等量小球藻。温度、盐度等条件与驯养期间相同,实验期间保证氧气泵连续曝气,在暴露后的第4、8天分别取样后按表1全部更换各组实验用水,期间不再投饵。第0、4和8天投喂的塔玛亚历山大藻终浓度分别为4 800、5 200和7 600 cells/mL。

表1 塔玛亚历山大藻暴露实验的水体配制表  
Tab. 1 Water preparation for exposure with *Alexandrium tamarensense*

组别 Groups	塔玛亚历山大藻原液或无细胞滤液 Whole-cell or filtrate group of <i>A. tamarensense</i> /mL	小球藻 <i>Chlorella vulgaris</i> /mL	灭菌海水 Sterilized seawater/mL
对照组 Control group	0	40	460
藻原液组 Whole-cell group	310	40	150
无细胞滤液组 Filtrate group	310	40	150

### 1.2.3 塔玛亚历山大藻毒性的测定

用麻痹性贝类毒素 (PSTs) 检测试剂盒 (上海化邦生物科技有限公司), ELISA 法分别测定藻原液和无细胞滤液中的 PSTs 浓度。

### 1.2.4 酶活测定

第 4、8 和 12 天时分别从对照组、藻原液组和无细胞滤液组的每个平行中随机选取 5 只贻贝, 取其软体部组织, 按质量 (g): 体积 (mL) = 1:10 加入预冷生理盐水, 冷冻研磨仪研磨处理, 3 000 ×g 离心 10 min 后取上清液, 用于 SOD、GPT、AKP、CAT 和 AChE 酶活性的测定。SOD 测试盒 (M78019)、GPT 测试盒 (M78023)、AKP 测试盒 (M78039) 和 CAT 测试盒 (M78632) 购自上海迈瑞尔生化科技有限公司, AChE 测试盒 (A930636) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司。蛋白浓度采用碧云天试剂盒 (BCA 法, P0010) 测定。每项指标测定均按说明书步骤进行, 每项酶促测定均进行 3 次重复。

### 1.2.5 累计死亡率测定

暴露后每隔 48 小时记录各组幼贝死亡情况, 用公式 (1) 计算校正累计死亡率。

$$M_c = \frac{q_t - q_c}{Q_t - q_c} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $M_c$  为校正累计死亡率, %;  $q_t$  为处理组幼贝累计死亡数;  $q_c$  为对照组幼贝累计死亡数;  $Q_t$  为各试验组幼贝总数。

### 1.3 综合生物标志物响应指数

多种生物标志物的综合效应通过综合生物标志物响应 (Integrated biomarker responses, IBR) 指数法进行量化。根据 DEVIN 等<sup>[14]</sup>修正的方法进行计算和评价:

(1)  $Y = (X - X_i)/s$ ,  $Y$  为生物标志物的标准化值,  $X$  为不同时间点下每个组别中每种标志物的平均值,  $X_i$  为各生物标志物的总平均值,  $s$  为总标准差。

(2)  $S = Z + |Z_{\min}|$ ,  $S \geq 0$ 。如果该种生物标志物被诱导, 则  $Z = Y$ , 反之  $Z = -Y$ 。 $|Z_{\min}|$  = 各  $Z$  值中最小值的绝对值。

(3) 根据  $S_i$  绘制雷达图, 用公式 (2) 计算相邻生物标志物围成的三角形面积之和, 即为 IBR 值。

$$IBR = \sum_{i=1}^n \frac{S_i \times S_i + 1 \times \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right)}{2} \quad (2)$$

### 1.4 统计分析

所有数据均采用平均值 ± 标准差 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示。采用 SPSS 27.0.1 软件对酶活性数据进行方差齐性检验和单因素方差分析。以  $P < 0.05$  作为差异显著性的标准。分析结果使用 GraphPad Prism 9 软件绘制。使用 Origin 2022 对所有指标进行主成分分析 (Principal component analysis, PCA)。

## 2 结果

### 2.1 塔玛亚历山大藻的毒性

塔玛亚历山大藻原液的藻细胞密度为 7 740 cells/mL, 其 PSTs 浓度为  $(65.50 \pm 0.52)$  ng/mL; 而浓度相同的塔玛亚历山大藻无细胞滤液的 PSTs 浓度为  $(63.14 \pm 10.91)$  ng/mL。

### 2.2 塔玛亚历山大藻原液、无细胞滤液对厚壳贻贝校正累计死亡率的影响

由图 1 可知, 塔玛亚历山大藻原液及无细胞滤液均对厚壳贻贝幼贝的存活产生胁迫, 并且与无细胞滤液相比, 塔玛亚历山大藻原液对厚壳贻贝的毒性作用更强。无细胞滤液组在暴露 4 d 后校正累计死亡率逐渐升高, 第 12 天时达到 15.66%; 而藻原液组在暴露 2 d 后校正累计死亡率就开始逐渐升高, 第 12 天时其校正累计死亡率达到 33.73%, 比无细胞滤液组高 115.39%。比较不同处理组累计死亡率, 从大到小依次为藻原液组 > 无细胞滤液组 > 对照组。

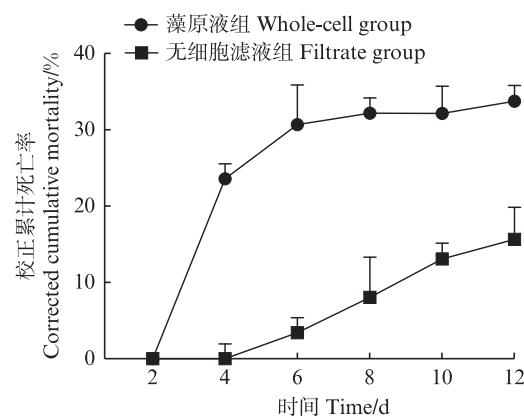


图 1 藻原液组和无细胞滤液组厚壳贻贝幼贝的校正累计死亡率变化

Fig. 1 Changes in the corrected cumulative mortality of juvenile *Mytilus coruscus* in whole-cell and filtrate groups

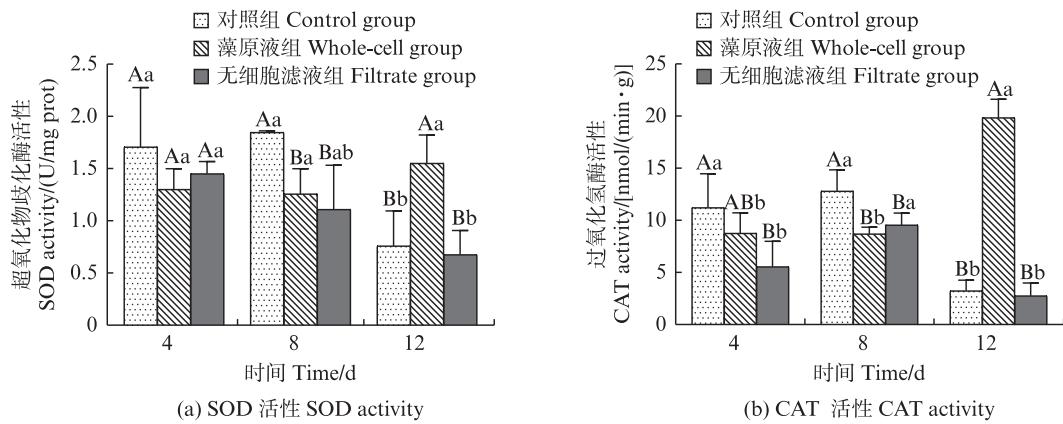
### 2.3 塔玛亚历山大藻胁迫下厚壳贻贝的抗氧化酶活性变化

塔玛亚历山大藻的胁迫显著影响厚壳贻贝

幼贝的抗氧化酶活性(图2)。12 d内藻原液组幼贝的SOD活性总体呈上升趋势(图2a);无细胞滤液组SOD活性呈下降趋势,12 d时SOD活性与4 d时相比显著降低( $P<0.05$ )。同一时间点下,3组之间SOD活性在4 d时无显著差异( $P>0.05$ );但8 d时,藻原液组和无细胞滤液组幼贝的SOD活性均显著低于对照组( $P<0.05$ );12 d时,藻原液组的SOD活性显著高于对照组和无细胞滤液组( $P<0.05$ ),其SOD活性为 $(1.55\pm0.27)$  U/(mg prot),约为对照组的204%。

厚壳贻贝幼贝在塔玛亚历山大藻胁迫下的CAT活性变化如图2b所示。12 d内藻原液组厚

壳贻贝的CAT活性呈现与SOD类似的变化趋势,12 d时藻原液组幼贝CAT活性与4 d和8 d时相比显著升高( $P<0.05$ );而无细胞滤液组,在胁迫8 d后CAT活性显著上升( $P<0.05$ ),且达到最高值( $9.54\pm1.15$ ) nmol/(min·g),之后开始下降。同一时间点下,在4 d时对照组CAT活性显著高于无细胞滤液组( $P<0.05$ );而在8 d时,藻原液组和无细胞滤液组CAT活性都显著低于对照组( $P<0.05$ );12 d时,藻原液组的CAT活性显著高于对照组和无细胞滤液组( $P<0.05$ ),其活性达到 $(19.85\pm1.76)$  nmol/(min·g),约为对照组活性的6倍。



不同大写字母表示同一时间点不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示同一处理组内不同时点之间差异显著( $P<0.05$ )。Different uppercase letters indicate significant differences among different treatment groups at the same time point ( $P<0.05$ ), while different lowercase letters indicate significant differences within the same treatment group at different time points ( $P<0.05$ )。

图2 实验开始后第4、8和12天时各处理组厚壳贻贝幼贝的SOD、CAT活性

Fig. 2 The SOD activity and CAT activity of juvenile *M. coruscus* in different treatment groups on the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, and 12<sup>th</sup> days after the start of the experiment

#### 2.4 塔玛亚历山大藻胁迫下厚壳贻贝的代谢相关酶活性变化

塔玛亚历山大藻胁迫明显影响厚壳贻贝幼贝GPT、AKP和AChE的活性(图3)。不同处理组厚壳贻贝幼贝GPT活性的变化见图3a。藻原液组幼贝的GPT活性在胁迫8 d后显著下降( $P<0.05$ ),然后回升;而无细胞滤液组GPT活性呈上升趋势,到12 d时活性显著升高( $P<0.05$ )。在胁迫4 d时,无细胞滤液组GPT活性显著低于对照组和藻原液组( $P<0.05$ ),但藻原液组与对照组无显著差异( $P>0.05$ );8 d时,藻原液组GPT活性显著低于对照组( $P<0.05$ ),约为对照组的63.14%,但此时无细胞滤液组与对照组、藻原液组无显著差异( $P>0.05$ );而12 d时,藻原液组GPT活性显著高于对照组和无细胞滤液组( $P<0.05$ ),但后两

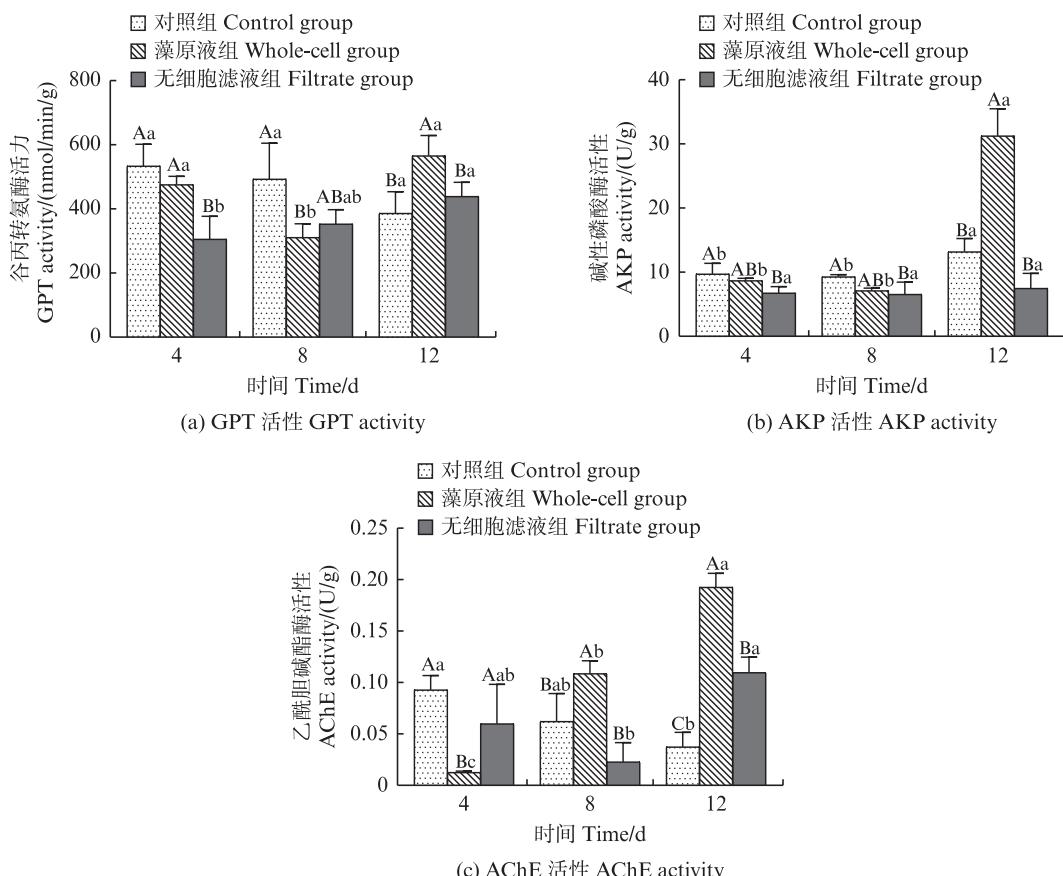
者之间无显著差异( $P>0.05$ )。

厚壳贻贝幼贝在塔玛亚历山大藻胁迫下的AKP活性变化情况如图3b所示。对照组和无细胞滤液组幼贝的AKP活性总体稳定;而藻原液组AKP活性在胁迫12 d后显著升高( $P<0.05$ )。对比同一时间点下的AKP活性可知,4和8 d时,无细胞滤液组的AKP活性显著低于对照组( $P<0.05$ ),而后者与藻原液组之间没有显著差异( $P>0.05$ );12 d时,藻原液组的AKP活性显著高于对照组和无细胞滤液组( $P<0.05$ ),约为对照组活性的2倍,此时对照组与无细胞滤液组之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。

酶活实验结果显示塔玛亚历山大藻对厚壳贻贝幼贝的AChE活性有明显影响(图3c)。藻原液组幼贝的AChE活性持续显著地上升( $P<$

0.05),并在12 d时达到峰值;无细胞滤液组的AChE活性先下降,之后在12 d时显著上升( $P<0.05$ )。胁迫4 d时,藻原液组幼贝的AChE活性显著低于对照组和无细胞滤液组,仅为对照组的

13.64%;而8 d时,藻原液组活性显著高于对照组和无细胞滤液组( $P<0.05$ );12 d时,对照组AChE活性最低,藻原液组最高,且三组两两之间差异显著( $P<0.05$ )。



不同大写字母表示同一时间点不同处理组之间差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示同一处理组不同时间点之间差异显著( $P<0.05$ )。Different uppercase letters indicate significant differences among different treatment groups at the same time point ( $P<0.05$ ), while different lowercase letters indicate significant differences within the same group at different time points ( $P<0.05$ )。

图3 实验开始后第4、8和12天时不同处理组厚壳贻贝幼贝的GPT、AKP和AChE活性

Fig. 3 The GPT activity, AKP activity and AChE activity of juvenile *M. coruscus* in different treatment groups on the 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, and 12<sup>th</sup> days after the start of the experiment

## 2.5 IBR分析

根据综合生物标志物响应指数,选择了抗氧化酶和代谢相关酶(GPT、SOD、AKP、AChE和CAT)用于雷达图(图4)的轴标准化。所有生物标志物均对暴露做出了响应,雷达图显示了暴露4、8和12 d时抗氧化酶和代谢相关酶活性的不同变化趋势。随着暴露时间的增加,对照组的IBR值总体上保持稳定,无细胞滤液组IBR值先下降后回升,而藻原液组IBR值从最初的0.451增加到7.508,反映塔玛亚历山大藻原液对幼贝具有较高的毒性效应。藻原液组和无细胞滤液组IBR

值变化趋势有所不同,表明在不同胁迫下贻贝可能会采取不同的适应机制。

## 2.6 主成分分析(PCA)

对暴露于塔玛亚历山大藻后的幼贝抗氧化和代谢相关酶活性进行主成分分析(PCA),第一和第二主成分解释了数据总方差的73.5%(图5),并且各生化指标之间均呈正相关。PC1解释了总方差的53.8%,受到所有酶活性的影响,其中CAT对PC1具有较大的贡献;PC2解释了总方差的19.7%,主要由SOD贡献,这条轴主要与暴露时间有关。

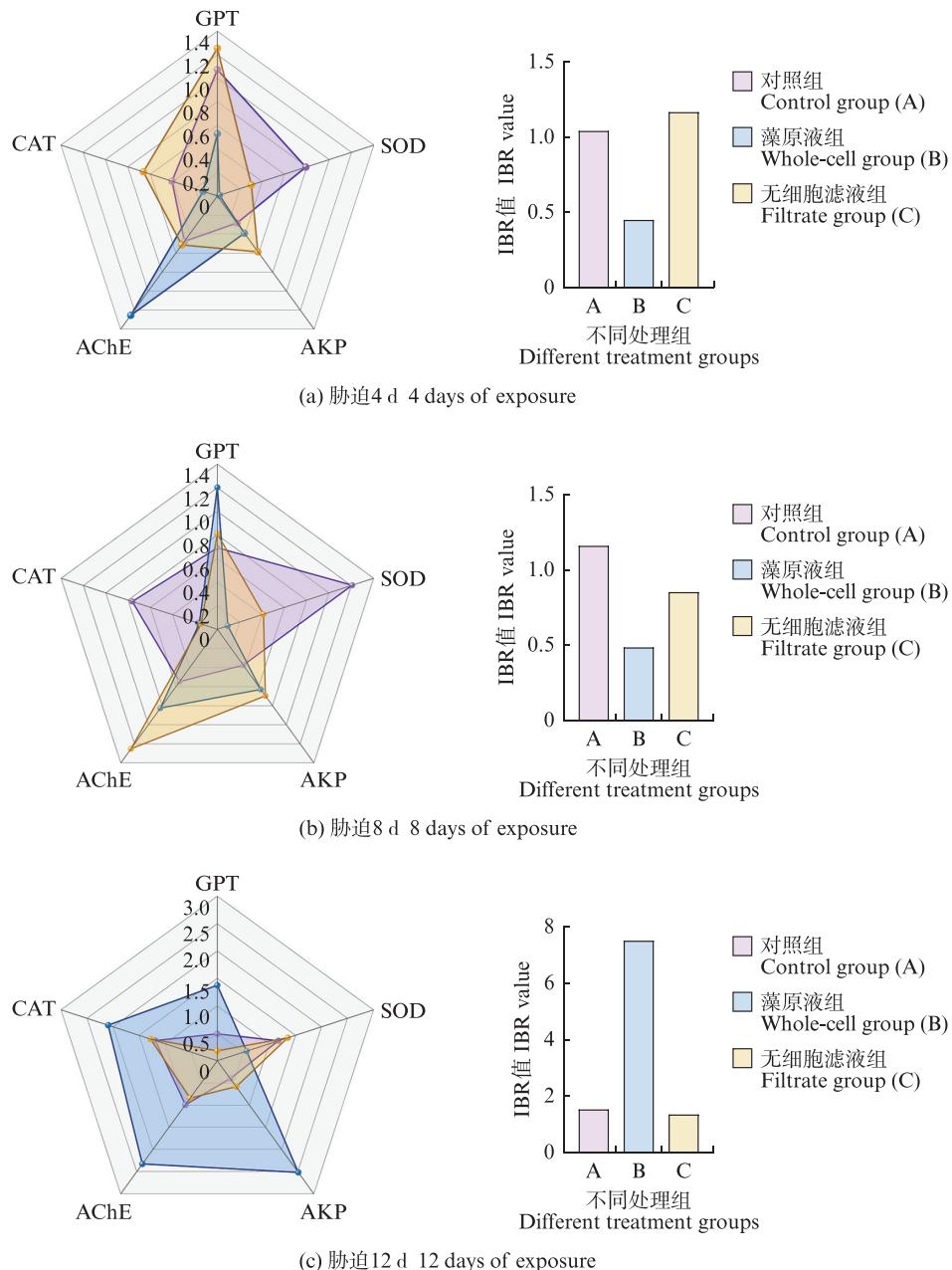


图4 实验不同阶段综合生物标志物响应雷达图和IBR值

Fig. 4 Radar plots of integrated biomarker response (IBR) and IBR values of biochemical indices in mussels at different stages of the experiment

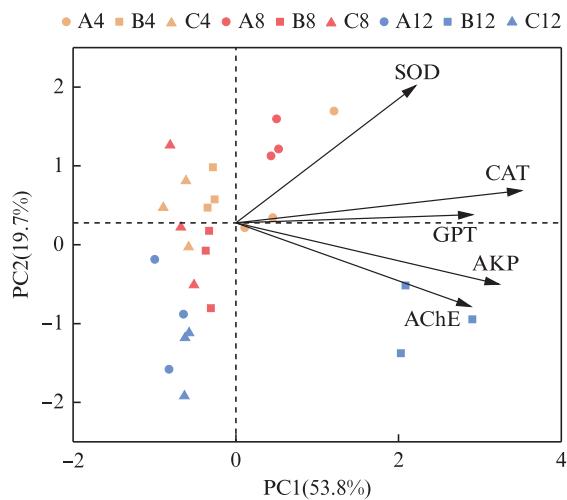
### 3 讨论

#### 3.1 塔玛亚历山大藻对厚壳贻贝幼贝存活的影响

亚历山大藻产生的一种重要化合物是PSTs, 其在脊椎动物神经细胞中作为钠离子通道阻滞剂进而使机体麻痹。尽管无脊椎动物比脊椎动物对藻毒素具有更高的耐受性, 但暴露于亚历山大藻中, 仍可能对双壳类产生神经毒性或细胞毒

性作用<sup>[12]</sup>。一系列研究表明亚历山大藻会对贝类幼虫的存活和发育产生影响。GREENHOUGH等<sup>[15]</sup>研究发现仅250 cells/mL的太平洋亚历山大藻(*A. pacificum*)原液即可导致绿唇贻贝(*Perna canaliculus*)胚胎裂解, 并使胚胎发育过程停滞。海湾扇贝(*Argopecten irradians*)D型幼虫在较高密度的塔玛亚历山大藻中暴露20 d后全部死亡<sup>[16]</sup>。类似的, 紫贻贝(*M. galloprovincialis*)幼虫死亡率也随着亚历山大藻

密度的升高而升高<sup>[17]</sup>。此外, PSTs会在贝类体内蓄积,WU等<sup>[1]</sup>研究表明投喂微小亚历山大藻(*A. minutum*)的厚壳贻贝从第4天开始快速蓄积PSTs,并在第7天达到峰值455.39  $\mu\text{g STXeq/kg}$ ,而贻贝的氧化应激和组织损伤水平也与组织中的PSTs含量呈正相关<sup>[18]</sup>。许多亚历山大藻会释放BECs,研究证实塔玛亚历山大藻产生的BECs具有溶血性和化感作用,会对双壳贝类的免疫功能、生长和摄食行为等产生影响<sup>[19]</sup>。本实验结果显示塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液均会对幼贝的生存产生胁迫,这可能归因于亚历山大藻产生的PSTs和BECs。目前研究表明,赤潮基准密度( $5.0 \times 10^5 \text{ cells/L}$ )的塔玛亚历山大藻对贻贝成贝的存活没有明显影响,但会诱导机体发生多种应激反应,如导致贻贝闭壳肌麻痹,引起壳阀微关闭,最终使清滤率下降<sup>[20]</sup>。本研究中的藻密度高于赤潮基准密度且分批持续暴露,推测影响幼贝存活的因素除藻密度外,可能也与暴露方式及厚壳贻贝的生长阶段和生理状态有关。颜天等<sup>[21]</sup>研究表明个体大小的不同也会导致其对外界环境的敏感性不同,其中高密度的塔玛亚历山大藻会使较小的鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼全部死亡,而较大的幼鱼不受影响。



图例为组别加胁迫时间;A. 对照组;B. 藻原液组;C. 无细胞滤液组。

The legend represents groups and stress duration; A. control group; B. whole-cell group; C. filtrate group.

图5 塔玛亚历山大藻胁迫下各项生理指标的主成分分析(PCA)

Fig. 5 Biplot of PCA with all measured variables under the stress of *A. tamarensse*

SUPONO等<sup>[17]</sup>将长约138  $\mu\text{m}$ 的紫贻贝幼虫暴露于赤潮基准密度的链状亚历山大藻(*A. catenella*)藻原液和无细胞滤液中48 h后,藻原液组幼虫死亡率高于无细胞滤液组,本研究得出类似结果。有报道显示塔玛亚历山大藻藻体会对水生生物的鳃造成机械损伤<sup>[22]</sup>,而鳃作为厚壳贻贝呼吸和滤食器官对贻贝的生存至关重要,这可能是藻原液组幼贝死亡率高于无细胞滤液组的原因之一。本研究测定了塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液中的PSTs含量,发现两者PSTs含量差异较小,推测存在其他因素导致藻原液组中幼贝死亡率高于无细胞滤液组。研究表明,亚历山大藻原液中化感物质活性通常高于上清液或滤液<sup>[23]</sup>,这可能是由于藻原液中活性物质会在培养过程中持续释放。此外,无细胞滤液毒性低于藻原液的原因也可能是毒性化合物在细胞外并不稳定,或亲脂性化合物会保留在甲藻细胞内,需要与靶细胞接触才能产生毒性作用<sup>[24]</sup>。

### 3.2 塔玛亚历山大藻对厚壳贻贝幼贝SOD和CAT活性的影响

麻痹性贝毒进入生物体后能够进行积累并发生转化,毒素的生物转化能力在很大程度上取决于每个物种的酶活性特征。活性氧自由基中的超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )是一种强氧化剂,能够引发细胞膜脂质过氧化,导致细胞膜结构和功能严重受损等一系列问题<sup>[25]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)的功能是催化 $\text{O}_2^-$ 转化为 $\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,迅速清除 $\text{O}_2^-$ ,以减轻其对细胞的氧化损伤<sup>[26]</sup>。CAT和SOD在抗氧化防御系统中起着协同作用,SOD将 $\text{O}_2^-$ 转化为 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,而CAT进一步将 $\text{H}_2\text{O}_2$ 分解为无害的 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{O}_2$ ,二者共同作用能有效保护细胞免受氧化应激的损伤。实验结果显示暴露于塔玛亚历山大藻原液中时,厚壳贻贝SOD与CAT活性的变化趋势呈现出一致性,胁迫4、8 d后,藻原液组和无细胞滤液组中SOD和CAT活性均显著低于对照组,表明厚壳贻贝暴露在亚历山大藻中时受到了严重的氧化胁迫,这可能是因为大量 $\text{O}_2^-$ 被SOD歧化生成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的过程中,生成的产物会抑制SOD的活性<sup>[27]</sup>。类似的,杨惠婕等<sup>[28]</sup>将凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)暴露于太平洋亚历山大藻中3和72 h,实验组对虾SOD活力也显著低于对照组。梁忠秀等<sup>[22]</sup>发现随着时间推移,塔玛亚历山大藻原液会诱导中国明对虾(*P. chinensis*)

鳃组织中 SOD 活性显著上升, 这与本研究中胁迫 12 d 时藻原液组厚壳贻贝 SOD 活性的变化相似。此外, TANG 等<sup>[29]</sup>研究发现, 微塑料和利马原甲藻 (*Prorocentrum lima*) 的单一或联合暴露均能显著提高厚壳贻贝组织中 CAT 活性。本实验中, 随着暴露时间延长, 藻原液组 SOD 和 CAT 活性的升高可能是由于塔玛亚历山大藻原液的胁迫导致厚壳贻贝幼贝代谢过程中产生过量的  $O_2^-$ , 机体为避免氧化损伤和脂质过氧化而反馈性增强抗氧化酶活性<sup>[30]</sup>。此外, PSTs 在生物体内积累会导致大量活性氧的增加, 引起氧化应激, 诱导抗氧化酶活性以减轻组织损伤<sup>[18]</sup>。

### 3.3 塔玛亚历山大藻对厚壳贻贝幼贝代谢相关酶活性的影响

谷丙转氨酶 (GPT) 广泛存在于细胞中, 尤其是肝脏细胞的线粒体中, 参与氨基酸的转化, 在糖异生和碳水化合物代谢中也具有重要作用。GPT 的水平能够反映氨基酸的代谢效率, 其活性的变化常用于判断肝损伤程度<sup>[31]</sup>。4 和 8 d 时, 藻原液组和无细胞滤液组厚壳贻贝 GPT 活性均低于对照组, 与谭志军<sup>[32]</sup>对鲈鱼的研究结果一致, 说明暴露于塔玛亚历山大藻使得厚壳贻贝幼贝的代谢功能受到一定程度的抑制, 这可能是暴露初期 (8 d 内) 贻贝应对环境变化的适应性调节。研究表明, 将厚壳贻贝暴露于高温、酸化或缺氧等不利条件下会诱导贻贝鳃组织中 GPT 活性升高<sup>[4]</sup>。12 d 时, 藻原液组幼贝的 GPT 活性显著高于对照组和无细胞滤液组, 表明贻贝的肝细胞可能受到损伤, 产生应激反应。此外, 研究表明 PSTs 在双壳贝类体内的转化作用可部分通过酶促反应进行, 其中组分 N-磺酰胺甲酰基类毒素 1-2 (C1 和 C2) 向 N-磺酰胺甲酰基类毒素 5 (GTX5) 的转化依赖 N-磺基转移酶, 后者能够将硫酸基团转移到受体分子上, 这一过程通常在肝脏进行, 是解毒代谢的关键步骤之一<sup>[33]</sup>。因此, 塔玛亚历山大藻产生的 PSTs 在贻贝体内积累可能激活了贻贝肝胰腺的解毒机制, 从而使得 GPT 活性显著升高。

碱性磷酸酶 (AKP) 作为溶酶体酶的重要组成部分, 在双壳类生物中参与多种生理代谢活动<sup>[28]</sup>, 起着重要的防御作用<sup>[34]</sup>。厚壳贻贝在高温<sup>[4]</sup>和高 pH<sup>[35]</sup>等不利环境中, 组织中 AKP 活性均显著下降。本研究中, 4 和 8 d 时无细胞滤液组

AKP 活性均显著低于对照组, 藻原液组 AKP 活性也低于对照组, 说明塔玛亚历山大藻胁迫使得厚壳贻贝幼贝免疫力降低, 同时也表明贻贝组织细胞的生理活动维持在较低水平, 这与暴露初期贻贝代谢功能受到抑制相一致。而较高的 AKP 活性表明水生动物在不利环境胁迫下产生了抗性<sup>[36]</sup>。KHAN 等<sup>[4]</sup>发现低 pH 会导致厚壳贻贝 AKP 活性显著升高。本研究中 12 d 时藻原液组幼贝的 AKP 活性显著高于对照组, 表明幼贝在应对氧化应激过程中, 可能通过增强溶酶体酶的作用来维持细胞内稳态和正常生理功能<sup>[35]</sup>。

塔玛亚历山大藻能够产生神经麻痹性毒素。AChE 存在于大多数动物体内, 负责快速水解神经递质乙酰胆碱, 大量研究证明了乙酰胆碱酯酶作为水生生物暴露于神经毒性化合物的生物标志物的有效性<sup>[37]</sup>。BASTI 等<sup>[38]</sup>发现有毒赤潮藻环状异帽藻 (*Heterocapsa circularisquama*) 会对菲律宾蛤仔和紫贻贝产生神经毒性影响, 并显著降低后两者的 AChE 活性。而本实验中暴露 4 d 时, 藻原液组厚壳贻贝 AChE 活性也显著低于对照组和无细胞滤液组, 说明塔玛亚历山大藻原液使贻贝神经系统的生理活性受到强烈抑制。此后藻原液组厚壳贻贝 AChE 活性持续升高, 无细胞滤液组 AChE 活性表现出先下降后上升的趋势, 至 12 d 时, 藻原液组和无细胞滤液组厚壳贻贝 AChE 活性均显著高于对照组, AChE 活性的改变表明塔玛亚历山大藻会对幼贝的神经冲动传递产生影响, 酶活的升高可能是对乙酰胆碱显著升高的负反馈调节, 目的是维持体内乙酰胆碱的稳态<sup>[39]</sup>, 具体的作用机制需要进一步探究。

综上所述, 本研究首次报道了塔玛亚历山大藻原液及无细胞滤液对厚壳贻贝幼贝存活及抗氧化和代谢相关酶活性的影响。研究结果表明, 幼贝在塔玛亚历山大藻胁迫的环境下, 可通过调节组织 SOD 和 CAT 活性等来应对氧化胁迫, 减少对机体的损伤, 同时调整 GPT、AKP 和 AChE 活性以维持正常的生理活动。毒性测定结果显示塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液中的 PSTs 毒素含量差异较小, 但 12 d 时藻原液组幼贝的 5 种酶活性均显著高于对照组和无细胞滤液组, 说明酶活性的升高还可能存在其他影响因素, 需要进一步验证。以上相关酶均可作为监测厚壳贻贝幼贝响应以塔玛亚历山大藻为优势种爆发的

有害藻华的有效指标,IBR值可用于评估塔玛亚历山大藻对潮间带生物综合生物毒性效应。此外,塔玛亚历山大藻原液和无细胞滤液对厚壳贻贝幼贝生理活性的影响有所区别,后续将进一步探索其致毒机制。

作者声明本文无利益冲突。

## 参考文献:

- [1] WU H Y, YANG Y C, ZHANG Q R, et al. Immune and physiological responses of *Mytilus unguiculatus* to *Alexandrium* spp. with varying paralytic shellfish toxin profiles [J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 935: 173483.
- [2] 陆浩磊,鲁仙,赵志森,等.环境胁迫对福寿螺肝胰脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J].上海海洋大学学报,2023,32(6):1184-1194.
- LU H L, LU X, ZHAO Z M, et al. Effects of environmental stress on the activities of antioxidant enzymes and malondialdehyde content in hepatopancreas of apple snails [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(6): 1184-1194.
- [3] 李海涛,赵志刚,徐伟,等.盐度驯化对大鳞鲃幼鱼生理生化和抗氧化免疫的影响[J].水产学报,2024,48(11):29-40.
- LI H T, ZHAO Z G, XU W, et al. Effects of salinity acclimation on physiology and biochemistry and antioxidant immunity of juvenile *Luciobarbus capito* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2024, 48(11): 29-40.
- [4] KHAN F U, CHEN H, GU H X, et al. Antioxidant responses of the mussel *Mytilus coruscus* co-exposed to ocean acidification, hypoxia and warming [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2021, 162: 111869.
- [5] BOUKADIDA K, BANNI M, ROMERO-RAMIREZ A, et al. Metal contamination and heat stress impair swimming behavior and acetylcholinesterase activity in embryo-larval stages of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Marine Environmental Research*, 2022, 179: 105677.
- [6] FREEMAN A S, MESZAROS J, BYERS J E. Poor phenotypic integration of blue mussel inducible defenses in environments with multiple predators [J]. *Oikos*, 2009, 118(5): 758-766.
- [7] SHUMWAY S E, CUCCI T L. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs [J]. *Aquatic Toxicology*, 1987, 10(1): 9-27.
- [8] QIU J B, MA F F, FAN H, et al. Effects of feeding *Alexandrium tamarensis*, a paralytic shellfish toxin producer, on antioxidant enzymes in scallops (*Patinopecten yessoensis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. *Aquaculture*, 2013, 396-399: 76-81.
- [9] 颜天,傅萌,刘红,等.双壳类清滤率在海洋污染物毒性研究中的应用[J].海洋科学,2003,27(1):50-53.
- YAN T, FU M, LIU H, et al. The use of bivalve filtration rate in toxicity study on marine pollutants [J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(1): 50-53.
- [10] 陈震楠,刘念,张跃环,等.亚硝酸态氮对菲律宾蛤仔浮游幼虫及幼贝的急性毒性[J].大连海洋大学学报,2019,34(3):399-404.
- CHEN Z N, LIU N, ZHANG Y H, et al. Acute toxicity of nitrite nitrogen to planktonic larvae and juveniles of Manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(3): 399-404.
- [11] LONG M, KROCK B, CASTREC J, et al. Unknown extracellular and bioactive metabolites of the genus *Alexandrium*: a review of overlooked toxins [J]. *Toxins*, 2021, 13(12): 905.
- [12] FORD S E, BRICELJ V M, LAMBERT C, et al. Deleterious effects of a nonPST bioactive compound(s) from *Alexandrium tamarensis* on bivalve hemocytes [J]. *Marine Biology*, 2008, 154(2): 241-253.
- [13] LONG M, TALLEC K, SOUDANT P, et al. A rapid quantitative fluorescence-based bioassay to study allelochemical interactions from *Alexandrium minutum* [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 242: 1598-1605.
- [14] DEVIN S, BURGEOT T, GIAMBÉRINI L, et al. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(4): 2448-2454.
- [15] GREENHOUGH H, VIGNIER J, PEYCHERS C, et al. Exposure to *Alexandrium* spp. impairs the development of green-lipped mussel (*Perna canaliculus*) embryos and larvae [J]. *Harmful Algae*, 2023, 127: 102465.
- [16] 陈桃英,颜天,刘利平,等.亚历山大藻对海湾扇贝受精卵孵化的影响及致毒机制研究[J].中山大学学报(自然科学版),2007,46(2):77-81.
- CHEN T Y, YAN T, LIU L P, et al. Impacts and toxic mechanism of dinoflagellate *Alexandrium* species on egg-hatching success of *Argopecten irradians* Lamarck [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2007, 46(2): 77-81.
- [17] SUPONO S, KNOWLES G, BOLCH C. Toxicity and histopathological effects of toxic dinoflagellate, *Alexandrium catenella* exudates on larvae of blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 2020, 12(2): 188-198.
- [18] NEVES R A F, NASCIMENTO S M, SANTOS L N. Harmful algal blooms and shellfish in the marine

- environment: an overview of the main molluscan responses, toxin dynamics, and risks for human health [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(40): 55846-55868.
- [19] BIANCHI V A, LANGEOH H, TILLMANN U, et al. Separate and combined effects of neurotoxic and lytic compounds of *Alexandrium* strains on *Mytilus edulis* feeding activity and hemocyte function [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 414-422.
- [20] LAVAUD R, DURIER G, NADALINI J B, et al. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* on the behaviour and physiology of the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. *Harmful Algae*, 2021, 108: 102097.
- [21] 颜天, 谭志军, 于仁诚, 等. 塔玛亚历山大藻对鲈鱼幼鱼毒性效应研究 [J]. *环境科学学报*, 2002, 22(6): 749-753.
- YAN T, TAN Z J, YU R C, et al. The effect of dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on juvenile perch *Lateolabrax japonicus* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(6): 749-753.
- [22] 梁忠秀, 李健, 李吉涛, 等. 塔玛亚历山大藻毒素及其对中国对虾的急性毒性 [J]. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1260-1267.
- LIANG Z X, LI J, LI J T, et al. The toxicity of *Alexandrium tamarense* to *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1260-1267.
- [23] LELONG A, HABERKORN H, LE GOÏC N, et al. A new insight into allelopathic effects of *Alexandrium minutum* on photosynthesis and respiration of the diatom *Chaetoceros neogracile* revealed by photosynthetic-performance analysis and flow cytometry [J]. *Microbial Ecology*, 2011, 62(4): 919-930.
- [24] KAMIYAMA T, ARIMA S. Lethal effect of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* upon the tintinnid ciliate *Favella taraikaensis* [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1997, 160: 27-33.
- [25] JIE Z S, LIU J, SHU M C, et al. Detection strategies for superoxide anion: a review [J]. *Talanta*, 2022, 236: 122892.
- [26] FRIDOVICH I. Superoxide radical and superoxide dismutase [J]. *Accounts of Chemical Research*, 1972, 5(10): 321-326.
- [27] SUN Y H, TANG R, LI D P, et al. Acute effects of microcystins on the transcription of antioxidant enzyme genes in crucian carp *Carassius auratus* [J]. *Environmental Toxicology*, 2008, 23(2): 145-152.
- [28] 杨惠婕, 张玉蕾, 刘碧洪, 等. 太平洋亚历山大藻对凡纳滨对虾的急性毒性效应 [J]. *广东海洋大学学报*, 2023, 43(3): 124-132.
- YANG H J, ZHANG Y L, LIU B H, et al. Acute toxic effects of *Alexandrium pacificum* on *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2023, 43(3): 124-132.
- [29] TANG X W, YU R, FAN M H, et al. Physiological and transcriptome analysis of *Mytilus coruscus* in response to *Prorocentrum lima* and microplastics [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 1087667.
- [30] GARCIA C, OYANEDER J, CONTRERAS H. Oxidative effects in aquatic organisms exposed to lipophilic marine biotoxins [M]. New York: Nova Science Publishers, 2017: 100-139.
- [31] HONG Y, JIANG W D, KUANG S Y, et al. Growth, digestive and absorptive capacity and antioxidant status in intestine and hepatopancreas of sub-adult grass carp *Ctenopharyngodonidella* fed graded levels of dietary threonine [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2015, 6: 34.
- [32] 谭志军. 塔玛亚历山大藻(*Alexandrium tamarense*)对鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的危害机制研究 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2006.
- TAN Z J. Toxic effects and its mechanism of dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on perch *Lateolabrax japonicus* [D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [33] 邱江兵. 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, 2014.
- QIU J B. Metabolic transformation of paralytic shellfish toxins by bivalve molluscs and their physiological and biochemical responses [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [34] MAZORRA M, RUBIO J, BLASCO J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(2): 241-249.
- [35] HU M H, LI L S, SUI Y M, et al. Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 573-583.
- [36] WU P, XU X H, YU T. Dietary watermelon residue influencing the nonspecific immunity of juvenile *Pseudoraspbora parva* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 118: 421-425.
- [37] CAJARAVILLE M P, BEBIANNO M J, BLASCO J, et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian peninsula: a practical approach [J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2/3): 295-311.
- [38] BASTI L, NAGAI S, WATANABE S, et al. Neuroenzymatic activity and physiological energetics in

- Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, during short-term [39] sublethal exposure to harmful alga, *Heterocapsa circularisquama*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 176: 76-87. TRIPATHI A, SRIVASTAVA U. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system [J]. *Annals of Neurosciences*, 2008, 15(4): 106-111.

## Effects of toxic *Alexandrium tamarensense* on the survival, antioxidant and metabolic enzyme activities of Juvenile *Mytilus coruscus*

ZHANG Ying<sup>1</sup>, CAI Chuner<sup>1,2</sup>, WANG Jingyi<sup>1</sup>, JIA Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Di<sup>1</sup>, HE Peimin<sup>1,2</sup>

(1. College of Oceanography and Ecological Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Water Environment and Ecology Engineering Research Center, Shanghai Institution of Higher Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to assess the ecological risks of the toxic red tide alga *Alexandrium tamarensense* to juvenile thick-shell mussels (*Mytilus coruscus*), juvenile mussels with an average shell length of (18.40±2.04) mm were selected, and the mortalities of juvenile *M. coruscus* over 12 days were calculated after continuous exposure to the culture and filtrate of *A. tamarensense*, tissue antioxidant enzymes and metabolism-related enzyme activities were also measured. The mortalities of juvenile mussels were recorded at 48 hours intervals in the control, whole-cell and filtrate groups, and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutamine-phosphatase (GPT), alkaline phosphatase (AKP), and acetylcholinesterase (AChE) of the individuals on 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days after exposure were analyzed. The results showed that the corrected cumulative mortality of juvenile mussels in the whole-cell and filtrate groups on the 12<sup>th</sup> day was 33.73% and 15.66%, respectively. Enzyme activity trends varied among the groups. The activities of SOD, CAT, AKP and AChE in the whole-cell group showed an overall increasing trend, and the GPT activity showed a decreasing and then increasing phenomenon. In the filtrate group, AKP activity remained relatively stable. After 8 days of continuous exposure, SOD and AChE activities showed a decreasing trend, while GPT and CAT activities increased. By day 12<sup>th</sup>, SOD and CAT activities had decreased, whereas GPT and AChE activities had increased. On the 12<sup>th</sup> day, the activities of five enzymes in the whole-cell group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The principal component analysis (PCA) showed that the physiological indicators were positively correlated, and the integrated biomarker response (IBR) index showed that the IBR value of the whole-cell group differed from the control group, indicating that the whole-cell culture of *A. tamarensense* has a high toxic effect on juvenile mussels. The results indicated that both the culture and filtrate of *A. tamarensense* above the baseline density of red tide would stress the survival of juvenile *M. coruscus*, inducing oxidative stress in mussels, and suppressing the metabolism function of juvenile mussels at the early stage of exposure. This study provides a reference for conducting scientific culture of *M. coruscus* during toxic red tide outbreaks.

**Key words:** *Mytilus coruscus*; *Alexandrium tamarensense*; juvenile mussel; antioxidant enzyme; metabolic enzyme; paralytic shellfish toxins