

УДК 574.64

ДОМОЕВАЯ КИСЛОТА В ЛАБОРАТОРНЫХ КУЛЬТУРАХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА *PSEUDO-NITZSCHIA* Н. PERAGALLO IN Н. PERAGALLO & М. PERAGALLO, 1900 И ПРОБАХ МОЛЛЮСКОВ ИЗ РОССИЙСКИХ ВОД ЯПОНСКОГО МОРЯ И ТИХООКЕАНСКИХ ВОД КАМЧАТКИ

© 2023 г. И. В. Стоник¹, * (ORCID: 0000-0003-1467-0374), Р. С. Попов² (ORCID: 0000-0002-1727-6164), А. П. Цурпало¹ (ORCID: 0000-0001-8162-8585), П. С. Дмитренко² (ORCID: 0000-0002-8191-6170), М. Ю. Щелканов^{1,3} (ORCID: 0000-0001-8610-7623), Т. Ю. Орлова¹ (ORCID: 0000-0002-5246-6967)

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН, Владивосток, 690041 Россия

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, 690022 Россия

³НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, 690087 Россия

*e-mail: innast2004@mail.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 21.04.2023 г.

Принята к публикации 08.06.2023 г.

Изучено содержание опасного амнестического токсина – домоевой кислоты (ДК) – в культурах диатомовых водорослей *Pseudo-nitzschia* и образцах двустворчатых моллюсков, собранных в российских водах Японского моря и в тихоокеанских водах п-ва Камчатка. Впервые подтверждено присутствие ДК в культурах *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) G.R. Hasle, 1993 и *P. delicatissima* (Cleve) Heiden, 1928 из тихоокеанских вод п-ва Камчатка с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Относительно высокие концентрации ДК зарегистрированы в образцах модиолуса курильского *Modiolus kurilensis* F.R. Bernard, 1983 (2.92 мг/кг по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) и 2.8 мг/кг по данным ИФА) и мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) (0.07 мг/кг по данным ВЭЖХ-МС и 0.2 мг/кг по данным ИФА), собранных в Японском море. Показано, что при оценке относительно низких концентраций амнезиотоксина (менее 5 нг/мл в культурах микроводорослей и менее 0.05 мг/кг в моллюсках) ИФА является альтернативой ВЭЖХ, которая не позволяет идентифицировать ДК в таких пробах.

Ключевые слова: диатомовые водоросли *Pseudo-nitzschia*, двустворчатые моллюски, домоевая кислота, Японское море, тихоокеанские воды п-ва Камчатка

DOI: 10.31857/S013434752305011X, **EDN:** IIIUTW

Домоевая кислота (ДК) – амнестический токсин, который продуцируют красная водоросль *Chondria armata* (Kützing) Okamura, 1907 и диатомовые микроводоросли из родов *Pseudo-nitzschia* Н. Peragallo in Н. Peragallo & М. Peragallo, 1900 и *Nitzschia* А.Н. Hassall, 1845 (Pulido, 2008; Bates et al., 2018). Это соединение относится к классу возбуждающих аминокислот и известно как агонист ионотропных глутаматных рецепторов (Pulido, 2008). Воздействие высоких концентраций ДК, способной накапливаться в моллюсках и других морских животных и передаваться по пищевым цепям, стало причиной многочисленных случаев отравлений и гибели рыб, птиц и морских млекопитающих, зарегистрированных преимущественно у побережья США и Канады, реже Франции, Португалии, Вьетнама и др. стран (Lelong et al., 2012; Trainer et al., 2012; McCabe

et al., 2016; Bates et al., 2018, и др.). Диатомеи рода *Pseudo-nitzschia* – потенциальные продуценты ДК – известны как одна из доминирующих групп токсичного фитопланктона в дальневосточных морях России (Stonik et al., 2011, 2019; Orlova et al., 2014). Однако данные о содержании ДК в планктоне и моллюсках из морей России немногочисленны. В частности, для российских вод Японского и Охотского морей ранее было показано наличие ДК в моллюсках из зал. Петра Великого (Orlova et al., 2008; Stonik et al., 2019) и прибрежных вод о-ва Сахалин (Могильникова и др., 2007), а также подтверждено присутствие этого токсина в лабораторных культурах *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) Hasle, 1995, *P. multistriata* (Takano) Takano, 1995 и *P. calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, 2003 из прибрежных вод г. Владивостока (Orlova et al., 2008; Stonik et al., 2019). Кроме того,

Таблица 1. Концентрации домоевой кислоты (пг/мл) в культурах *Pseudo-nitzschia* из российских вод Японского моря и тихоокеанских вод п-ва Камчатка, установленные с помощью ИФА-сELISA

Название клона	Вид (место сбора)	Возраст культуры (сут)	Суммарная концентрация домоевой кислоты
MBRU_PMS-21	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i> (Японское море)	19	ND
		26	1958.2
		33	611.3
		40	186.7 ± 31.98*
MBRU_PP-21	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (тихоокеанские воды п-ва Камчатка)	19	ND
		26	2263.3
		33	2663.3
		40	ND
MBRU_PD-19	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (тихоокеанские воды п-ва Камчатка)	40	159.5

*Указано среднее значение ± стандартное отклонение. Примечание. ND – значения концентраций ниже предела определения.

наличие ДК было подтверждено в клетках *P. calliantha* из российских вод Черного моря в районе г. Севастополь (Рябушко и др., 2008; Besikterpe et al., 2008). Для других акваторий дальневосточных морей России, в особенности для прибрежных вод п-ва Камчатка – единственного региона, где отмечены достоверные случаи гибели людей вследствие токсичных “цветений” фитопланктона (Лебедев, 1968; Куренков, 1973; Коновалова, 1999), данные о концентрациях ДК в планктоне и моллюсках отсутствуют.

В настоящей работе мы применили два метода определения концентрации ДК – иммуноферментный анализ и высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией – в культурах *Pseudo-nitzschia* и образцах двустворчатых моллюсков из российских вод Японского моря и северо-западной части Тихого океана у берегов п-ва Камчатка.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культуры микроводорослей

Материалом послужили клоны двух видов диатомовых водорослей рода *Pseudo-nitzschia*: *P. delicatissima* (Cleve) Heiden, 1928 (MBRU_PD-19) и *P. pungens* (Grunow ex Cleve) G.R. Hasle, 1993 (MBRU_PP-21), изолированные из Авачинской бухты (53°0' с.ш., 158°38' в.д.) у тихоокеанского берега п-ва Камчатка в сентябре 2019 г. и октябре 2021 г. соответственно, а также клон *P. multistriata* (MBRU_PMS-21), изолированного из Амурского залива Японского моря вблизи мыса Красный (43°19' с.ш., 131°54' в.д. и 43°12' с.ш., 131°50' в.д.) в октябре 2021 г. в период “цветения” этого вида. Культуры поддерживали в ЦКП РК “Морской биобанк” НИЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru/index.php/ru/>). Клоны выращивали в колбах Эрленмейера объемом 400 мл с культуральной средой

f/2 при температуре 18°C и освещенности 3500 лк в каждой колбе. Для анализа суммарной концентрации домоевой кислоты в суспензии клеток (клетки плюс среда) культуру тщательно перемешивали и отбирали пробу объемом 50 мл на 19-е, 26-е, 33-е и 40-е сут содержания в культуре для клонов MBRU_PP-21 и MBRU_PMS-21 и на 40-е сут – для клон MBRU_PD-19 (табл. 1). Пробы для определения суммарной концентрации ДК обрабатывали на ультразвуковой установке Branson Sonifier 450 (Branson Ultrasonics Corp., США) мощностью 100 Вт с помощью зонда диаметром 1 см, при охлаждении на льду в течение 2–4 мин, чтобы разрушить клетки, и затем проверяли результаты этого процесса под световым микроскопом. При необходимости повторяли процедуру. Пробу фильтровали через мембранный фильтр Millex-GS Syringe Filter Unit (смешанные эфиры целлюлозы) с размером пор 0.22 мкм (Merck, Германия). Суммарную концентрацию ДК в культурах (пг/мл) вследствие низких значений измеряли только методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

ОБРАЗЦЫ МОЛЛЮСКОВ

Пробы *Mytilus trossulus* A. Gould, 1850 отбирали в Авачинской бухте в сентябре 2021 г., а *Modiolus kurilensis* F.R. Bernard, 1983 и *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) – в Амурском заливе вблизи мыса Красный в октябре 2021 г. (табл. 2). Навеску мягких тканей каждого вида массой 50 г гомогенизировали с помощью блендера, к навеске гомогената массой 4 г прибавляли 16 мл 50%-го раствора метанола. Материал перемешивали на вортексшейкере Heidolph Reax top (Heidolph, Германия) в течение 1 мин, затем центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин (центрифуга NF 800R; Nuve, Турция) и отбирали надосадочную жидкость для анализа. Содержание ДК в моллюсках

Таблица 2. Концентрации домоевой кислоты (мг/кг) в пробах двустворчатых моллюсков из российских вод Японского моря и тихоокеанских вод п-ва Камчатка, установленные с помощью методов ВЭЖХ-МС и ИФА-cELISA

Место (дата) сбора	Вид	Метод ВЭЖХ-МС	Метод ИФА-cELISA
Тихоокеанские воды п-ва Камчатка, Авачинская бухта (23.09.2021)	<i>Mytilus trossulus</i>	ND	ND
Российские воды Японского моря, Амурский залив, у мыса Красный (21.10.2021)	<i>Modiolus kurilensis</i>	2.92	2.8
	<i>Crenomytilus grayanus</i>	0.07	0.2

Примечание. ND – значения концентраций ниже предела определения.

определяли с помощью прямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) и высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

ИФА

ИФА выполняли с использованием набора реагентов ASP direct cELISA kit (Biosence Laboratories AS, Норвегия), прошедшего полную межлабораторную проверку в международном масштабе, по результатам которой утвержден официальный метод АОАС 2006.02 (Official methods..., 2006), рекомендованный Регламентом Комиссии (ЕС) No 1244/2007 (Commission Regulation..., 2007) для целей скрининга моллюсков на содержание ДК. Подготовку проб и анализ выполняли в соответствии с рекомендациями производителя (Domоic Acid ELISA, Microtiter Plate).

Непосредственно перед проведением анализа аликвоту проб моллюсков и культур микроводорослей разбавляли буферным раствором (10%-й метанол в фосфатном буфере с твином 20, рН 7.4). Каждую пробу анализировали в трех повторностях, которые соответствовали трем разным разбавлениям пробы буферным раствором. Для каждого разведения (повторности) анализировали попадание в рабочий диапазон калибровочной кривой 10–250 пг/мл. В одном случае (проба культуры MBRU_PMS-21 на 40-е сутки культивирования) были получены три значения, соответствующие рабочему диапазону калибровочной кривой, и на их основе вычислено среднее значение \pm стандартное отклонение (табл. 1). Измерения оптической плотности растворов выполняли с помощью ридера (микропланшетного фотометра) EI 800G (BioTek Instruments, США) с фильтром 450 нм. Предел количественного определения – 0.010 мг/кг согласно информации, размещенной на сайте поставщика (Экосистема Стайлаб).

ВЭЖХ-МС

Подготовку проб к анализу проводили методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Для этого аликвоту экстракта моллюска объемом 4 мл упаривали при пониженном давлении, используя центрифугу-концентратор Eppendorf Concentra-

tor plus (Eppendorf, Германия), перерастворили в 2 мл 50%-го метанола и очищали при помощи ТФЭ. Картридж для ТФЭ Bond Elut C18 100 мг, 1 мл (Agilent Technologies, США) предварительно кондиционировали 3 мл метанола и 3 мл воды. Анализируемый экстракт медленно пропускали через картридж по каплям (скорость потока около 1 мл/мин), картридж с нанесенной пробой промывали 3 мл 0.5%-го раствора муравьиной кислоты. Элюирование ДК проводили 1.7 мл 50%-го метанола. Для ВЭЖХ использовали колонку Poroshell 120 SB-C18 2.1 \times 150 мм, размер частиц 1.9 мкм (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования, используя хроматограф Bruker Elute UHPLC (Bruker Daltonics, Германия), который состоял из блока насосов Elute Pump HPG 1300, автосамплера Elute Autosampler UHPLC и колоночного термостата Elute Column Oven. В качестве подвижной фазы использовали 0.1%-й водный раствор муравьиной кислоты (фаза А) и 0.1%-й раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (фаза Б) при скорости потока 0.4 мл/мин. Программа градиента: 0–1.5 мин – 5% фазы Б, до 10 мин – градиент до 40% фазы Б, до 21 мин – градиент до 100% фазы Б, 21–25 мин – 100% фазы Б; 25.1–28 мин – 5% фазы Б. Температура колонки 40°C, объем вводимой пробы 10 мкл. Выбор данной программы градиента был обусловлен дополнительной задачей обнаружения в тканях моллюсков липофильных токсинов – окадаиковой кислоты, динофизистоксина-1 и бреветоксина-3. Однако других известных токсинов, кроме домоевой кислоты, в изученных образцах обнаружено не было.

Масс-спектрометрическое детектирование ДК осуществляли на приборе Bruker impact II QTOF (Bruker Daltonics, Германия) при положительной ионизации электроспреем. Параметры работы источника ионизации: напряжение на капилляре 4500 В, газ-осушитель азот при объемном потоке 6 л/мин, давлении 2.5 бар, температуре 200°C. Запись масс-спектров проводили в режиме сканирования в диапазоне от 50 до 2000 m/z . Настройку масс-спектрометра выполняли при помощи смеси Agilent ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies, США). Анализ ВЭЖХ-МС хроматограмм проводили с помощью программ

otofControl (версия 4.1) и DataAnalysis (версия 4.4) (Bruker Daltonics, Германия). ДК детектировали по хроматографическому пику со временем удерживания 5.1 мин на хроматограмме, построенной по току иона $[M + H]^+$ при m/z 312.14 ± 0.02 .

Для подтверждения специфичности методики был проведен анализ образцов ткани мидии тихоокеанской *M. trossulus*, собранной в Амурском заливе в августе 2020 г., не содержащей ДК в пределах обнаружения метода. Количественное определение ДК в пробах моллюсков проводили с использованием метода внешнего стандарта. Калибровочные стандарты готовили путем добавления ДК к гомогенату ткани мидии. Исходный (стандартный) раствор ДК – NRC CRM-DA-f (National Research Council, Канада) – с концентрацией 101.8 мкг/мл (Thomas et al., 2008) добавляли к навескам гомогената массой 4 г в таких количествах, чтобы получить концентрации ДК в ткани 0.02, 0.04, 0.4, 2 и 4 мг/кг. После добавления ДК гомогенат перемешивали в течение 1 мин на вортекшейкере Heidolph Reax top и затем прибавляли 16 мл 50%-го раствора метанола. Дальнейшую подготовку проб к анализу методом ВЭЖХ-МС проводили как описано выше для ИФА.

Построение градуировочной кривой осуществляли по площади хроматографических пиков на хроматограммах, построенных по току иона домоевой кислоты $[M + H]^+$ при m/z 312.14 ± 0.02 ($R^2 = 0.9905$). Полученную калибровочную зависимость использовали для вычисления концентрации ДК в анализируемом образце, после чего вычисляли содержание ДК в исходной пробе по формуле $C = (C1 \times V \times 10^{-6})/m$, где $C1$ – концентрация домоевой кислоты в исходном образце (нг/мл), V – объем экстракта (16 мл), m – масса ткани моллюска, используемая для получения экстракта (0.004 кг).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрации домоевой кислоты, определенные в культурах диатомовых водорослей методом ИФА-сELISA, в пробах моллюсков – ИФА-сELISA и ВЭЖХ-МС, приведены в табл. 1 и 2.

ДК в культурах микроводорослей

Суммарная концентрация ДК в клоне *Pseudo-nitzschia multistriata* из Амурского залива варьировала от 187 до 1958 пг/мл с максимумом на 26-е сут культивирования, в клоне *P. pungens* из Авачинской бухты изменялась от 2263 до 2663 пг/мл с максимумом на 33-и сут. Суммарная концентрация ДК в клоне *P. delicatissima* из Авачинской бухты на 40-е сут культивирования составила 159 пг/мл (табл. 1).

ДК в моллюсках

Хроматограммы по току иона ДК в образцах *Crenomytilus grayanus* и *Modiolus kurilensis* представле-

ны на рис. 1. При анализе методом ВЭЖХ-МС ДК выходила несимметричным пиком, имеющим время удерживания 5.1 мин (рис. 1), тогда как на хроматограммах калибровочных стандартов присутствовал симметричный пик. Вероятно, наличие на хроматограммах несимметричных пиков может быть вызвано присутствием суммы ДК с примесью ее изомеров.

Относительно высокие концентрации ДК зарегистрированы в образцах моллюсков модиолуса курильского (2.92 мг/кг по данным ВЭЖХ-МС и 2.8 мг/кг по данным ИФА) и мидии Грея (0.07 мг/кг согласно ВЭЖХ-МС и 0.2 мг/кг согласно ИФА), собранных в Амурском заливе в конце октября 2021 г. (табл. 2) в период “цветения” *P. multistriata*. ДК не обнаружена в *Mytilus trossulus* из камчатских вод.

ОБСУЖДЕНИЕ

В материале, собранном у п-ва Камчатка, впервые подтверждено присутствие домоевой кислоты при относительно низких концентрациях в культурах двух видов диатомей (*Pseudo-nitzschia pungens* и *P. delicatissima*) методом ИФА (табл. 1, 2). Наиболее высокая суммарная концентрация ДК в изученных нами культурах найдена в клоне *Pseudonitzschia pungens* (2663 пг/мл), изолированном из тихоокеанских вод п-ва Камчатка.

ДК найдена и в пробах моллюсков из российских вод Японского моря.

Максимальное содержание токсина отмечено в *Modiolus kurilensis*, где наблюдали накопление ДК в конце октября 2021 г. (табл. 2) вследствие “цветения” воды, вызванного *P. multistriata*. Хотя концентрации ДК в модиолусе (2.8–2.92 мг/кг) оказались ниже утвержденного допустимого предела в 20 мг/кг (Технический регламент..., 2011), они приблизительно на порядок превышали значения (0.1–0.3 мг/кг), ранее отмеченные в пробах двустворчатых моллюсков из этого района (Stonik et al., 2019).

Относительно высокие концентрации ДК в моллюсках позволили нам наряду с ИФА впервые применить метод ВЭЖХ-МС для анализа этого токсина в моллюсках из российских вод Японского моря. Сходные концентрации ДК, полученные для двух видов моллюсков из Японского моря методами ИФА и ВЭЖХ-МС (табл. 2), указывают на возможность использования обоих этих методов для определения ДК в моллюсках из района исследования.

В отличие от анализа методом ИФА, ВЭЖХ-МС анализ показал возможное присутствие в некоторых случаях изодомоевых кислот (Saeed et al., 2017). Поскольку основной пик ДК хроматографически неотделим от сопутствующих пиков, а изомерные домоевые кислоты имеют аналогичные масс-спектры, полученные нами результаты представляют собой данные для суммы ДК и ее изомеров.

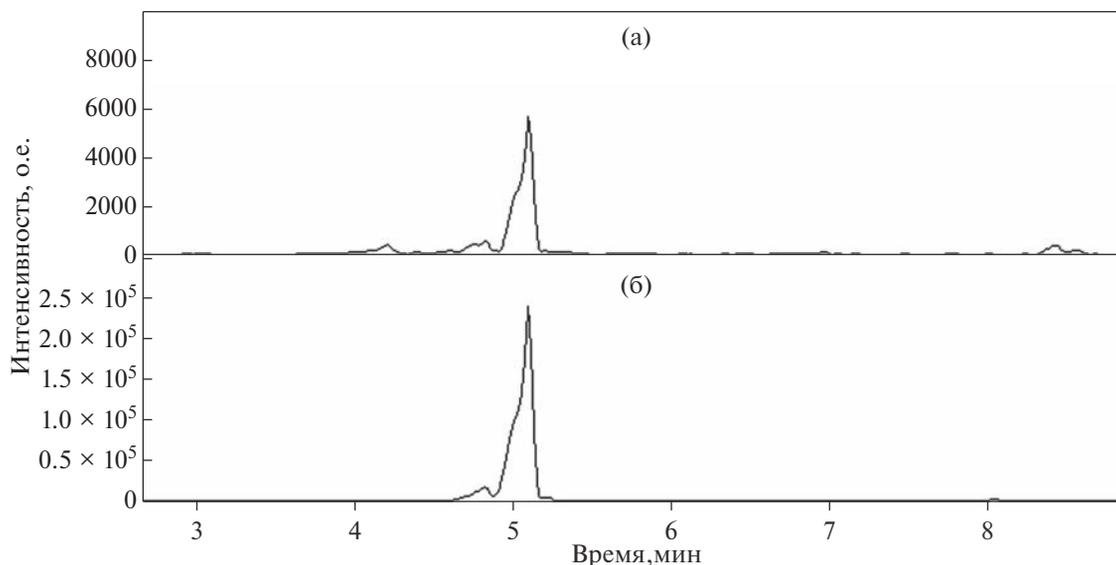


Рис. 1. Хроматограммы по току иона домоевой кислоты $[M + H]^+$ при m/z 312.14 ± 0.02 экстракта моллюсков мидии Грея *Crenomytilus grayanus* (а) и модиолуса курильского *Modiolus kurilensis* (б), полученные методом ВЭЖХ-МС. Условные обозначения: “о. е.” – относительные единицы.

Таким образом, ИФА, как более чувствительный из двух методов, оказался оптимальным для измерения относительно низкого содержания ДК в культурах диатомовых водорослей из прибрежных вод п-ва Камчатка. Метод ВЭЖХ-МС позволил выполнить измерения в образцах двух видов моллюсков из российских вод Японского моря, где содержание токсина превышало 0.05 мг/кг.

Методом, утвержденным перечнями международных и региональных (межгосударственных) стандартов, необходимыми для применения и исполнения требований ТР ТС 021/2011 для контроля ДК, является ВЭЖХ (Определение домоевой кислоты..., 2008), регламентированный ГОСТ EN 14176–2015. Однако при оценке относительно низких концентраций амнезиотоксина (менее 5 нг/мл в культурах микроводорослей и менее 0.05 мг/кг в моллюсках) ИФА является альтернативой ВЭЖХ, которая не позволяет идентифицировать ДК в таких пробах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследования содержания амнезиотоксина методом ИФА поддержаны грантом Министерства науки и высшего образования РФ “Исследование организмов – продуцентов фикотоксина Камчатки”

(FWFE-2023-0001). Измерения содержания токсина методом ВЭЖХ-МС поддержаны грантом Министерства науки и высшего образования РФ “Развитие и применение методов химической характеристики токсических морских микроводорослей” (FWFZ-2022-0001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Коновалова Г.В. “Красные приливы” и “цветение” воды в дальневосточных морях России и прилегающих акваториях Тихого океана // Биол. моря. 1999. Т. 25. С. 263–273.
- Куренков И.И. “Красный прилив” в Авачинской бухте в 1973 г. // Отчет № 6294818. Архив КО ТИПРО. Петропавловск-Камчатский. 1973. 23 с.
- Лебедев С.П. Внимание: “красный прилив” // Рыбное хозяйство. 1968. № 5. С. 19–20.
- Могильникова Т.А., Мотылькова И.В., Коновалова Н.В. О развитии массовых токсичных видов фитопланктона и содержании фикотоксинов в тканях гребешка *Mizuhopecten yessoensis* Jay в прибрежных водах о. Сахалин // Тр. СахНИРО. 2007. Т. 9. С. 207–222.
- Определение домоевой кислоты в морепродуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методические указания. МУК 4.1.2229-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2008. 11 с.
- Рябушко Л.И., Бесиктене С., Едигер Д. и др. Токсичная диатомовая водоросль *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle из Черного моря: морфология, таксономия, экология // Мор. экол. журн. 2008. Т. 7. № 3. С. 51–60.
- Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 “О безопасности пищевой продукции” (с изменениями на 14 июля 2021 года). <https://docs.cntd.ru/document/902320560>.
- Экосистема Стайлаб. Фикотоксины. Домоевая кислота. Тест-система ASP Plate kit. <https://stylab.ru/directory/phyco toxins/domeovaya-acid/a31300401-096-asp/>.

- Bates S.S., Hubbard K.A., Lundholm N. et al. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: new research since 2011 // *Harmful Algae*. 2018. V. 79. P. 3–43. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2018.06.001>
- Besiktepe S., Ryabushko L., Ediger D. et al. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (Bacillariophyta) isolated from the Black Sea // *Harmful Algae*. 2008. V. 7. № 4. P. 438–442.
- Commission Regulation (EC) № 1244/2007 of 24 October 2007 amending Regulation (EC) № 2074/2005 as regards implementing measures for certain products of animal origin intended for human consumption and laying down specific rules on official controls for the inspection of meat // *Off. J. Eur. Union*. 25.10.2007. L 281. V. 50. P. 12–18. <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1244/oj>.
- Domoic acid (ASP) ELISA, microtiter plate. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of domoic acid in water, seawater and shellfish samples. Product no. 520505. 4 p. <https://www.biosense.com/pdfs/L35000435.pdf>.
- Lelong A., Hégarret H., Soudant Ph., Bates S.S. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms // *Phycologia*. 2012. V. 51. P. 168–216.
- McCabe R.M., Hickey B.M., Kudela R.M. et al. An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions // *Geophys. Res. Lett.* 2016. V. 43. P. 10366–10376.
- Official methods of analysis of AOAC International: 19th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International. 2006. Official method 2006.02.
- Orlova T.Yu., Stonik I.V., Aizdaicher N.A. et al. Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan // *Bot. Mar.* 2008. V. 51. № 4. P. 297–306.
- Orlova T., Morozova T., Kameneva P., Schevchenko O. Harmful algal blooms on the Russian east coast and their possible economic impacts // *PICES Sci. Rep.* 2014. № 47. P. 41–58.
- Pulido O.M. Domoic acid toxicologic pathology: a review // *Mar. Drugs*. 2008. V. 6. № 2. P. 180–219.
- Saeed A.F., Awan S.A., Ling S. et al. Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics // *Algal Res.* 2017. V. 24. Part A. P. 97–110.
- Stonik I.V., Orlova T.Yu., Lundholm N. Diversity of *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo from the western North Pacific // *Diatom Res.* 2011. V. 26. № 1. P. 121–134.
- Stonik I.V., Orlova T.Yu., Chikalovets I.V. et al. *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) and the domoic acid concentration in *Pseudo-nitzschia* cultures and bivalves from the northwestern Sea of Japan, Russia // *Nova Hedwigia*. 2019. V. 108. № 1–2. P. 73–93. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2018/0502
- Thomas K., Tremblay M.-L., Walter J.A., Quilliam M.A. NRC CRM-DA-f, a certified calibration solution reference material for domoic acid // *CRMP Tech. Rep. CRM-DA-f-20071205*. 2008.
- Trainer V.L., Bates S.S., Lundholm N. et al. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health // *Harmful Algae*. 2012. V. 14. P. 271–300. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.025>

Domoic Acid in Cultures of the Diatom Genus *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo in H. Peragallo & M. Peragallo, 1900 and in Bivalve Samples from the Russian Waters of the Sea of Japan and the Pacific Waters of Kamchatka

I. V. Stonik^a, R. S. Popov^b, A. P. Tsurpalo^a, P. S. Dmitrenok^b, M. Yu. Shchelkanov^{a,c}, and T. Yu. Orlova^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

^bG.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^cSomov Research Institute of Epidemiology and Microbiology by Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Vladivostok, 690087 Russia

Content of a dangerous amnesic toxin – domoic acid (DA) – was determined in cultures of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* and in bivalve samples collected in the Russian waters of the Sea of Japan and off the Pacific coast of Kamchatka. For the first time, the presence of DA has been confirmed in cultures of *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) G.R. Hasle, 1993 and *P. delicatissima* (Cleve) Heiden, 1928 from the Pacific coast of Kamchatka with the use of the competitive enzyme-linked immuno-sorbent assay (cELISA). Relatively high concentrations of DA were recorded in the horse mussel *Modiolus kurilensis* F.R. Bernard, 1983 (2.92 mg/kg based on high-performance chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) and 2.8 mg/kg based on cELISA) and in the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (0.07 mg/kg based on HPLC-MS and 0.2 mg/kg based on cELISA) collected in the Sea of Japan. It has been shown that for assessing relatively low concentrations of amnesiotoxin (less than 5 ng/ml in microalgal cultures and less than 0.05 mg/kg in mollusks) cELISA assay is an alternative to HPLC that does not allow to detect DA in such samples.

Keywords: Diatom algae *Pseudo-nitzschia*, bivalve mollusks, domoic acid, the Sea of Japan, the Pacific waters of Kamchatka