

半褶织纹螺(*Nassarius semiplicatus*)及其生活环境中分离培养的细菌毒性测试与种类分析

王晓杰^{1,2}, 于仁成^{1*}, 罗璇^{1,2}, 周名江¹, 沈进进³, 顾振国³

(¹中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071)

(²中国科学院研究生院, 北京 100039)

(³盐城市疾病预防控制中心, 盐城 224002)

摘要: 在中国沿海地区, 因食用织纹螺导致的中毒事件时有发生。最近的研究表明, 河豚毒素及其衍生物是织纹螺中主要的致毒成分。但是, 对于织纹螺中河豚毒素的来源还不清楚。【目的】本研究尝试分离、培养和鉴定织纹螺及其生活环境中的细菌, 并对其毒性进行分析, 为探明织纹螺中河豚毒素的可能来源提供科学依据。【方法】先后于 2006 年 6 月 13 日和 19 日在江苏省盐城采集织纹螺样品, 应用小鼠生物法对织纹螺样品的毒性进行了测试; 从织纹螺体内及其生活环境中分离细菌, 并选择部分菌株进行了室内培养; 以直接竞争酶联免疫分析方法 (ELISA) 对培养菌株中的河豚毒素进行了检测; 通过对细菌 16S 核糖体 DNA (rDNA) 部分序列的测定, 对有毒菌株进行了初步的种类分析。【结果】实验结果表明, 采集的织纹螺为半褶织纹螺, 两次采集样品的毒性分别为 247 MU (mouse unit, 小鼠单位) 和 270 MU/100g 组织 (湿重)。对 14 个菌株进行了毒性检测, 其中有 9 株有毒细菌。产毒菌株的毒性普遍较低, 毒性范围为 15~96 ng/g。有毒菌株核糖体序列与弧菌 (*Vibrio*)、希瓦氏菌 (*Shewanella*)、动性球菌 (*Planococcus*)、海单胞菌 (*Marinomonas*)、发光杆菌 (*Photobacterium*) 等菌属有较高的相似性, 可能具有较近的亲缘关系。【结论】研究发现半褶织纹螺体内及其生活环境中存在能够产生河豚毒素的细菌, 说明织纹螺中的河豚毒素可能与其体内及其生活环境中的细菌有关, 有必要进行深入研究。

关键词: 织纹螺; 河豚毒素; 细菌; ELISA; 16S rDNA

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0911-06

织纹螺 (*Nassarius* spp.) 生活在沿海浅滩的沙质或泥质海底, 广泛分布于世界沿海。由于织纹螺味道鲜美, 我国部分沿海居民有食用织纹螺的习惯。近 20 年来, 我国福建、浙江、江苏等沿海地区多次发生因食用织纹螺导致的中毒事件, 导致数百人中毒, 严重时甚至出现人员死亡。近年来, 内陆城市银川、北京也发生了严重的食用织纹螺中毒事件。通过对 2002 年福建莆田和 2003 年江苏盐城导致中毒的织纹螺

进行分析, 发现两个织纹螺样品中均含有高浓度的河豚毒素及其衍生物, 并推断河豚毒素及其衍生物是织纹螺中的主要致毒成分^[1]。

河豚毒素 (tetrodotoxin, TTX) 是一种毒性极强的海洋生物毒素, 广泛存在于一系列不同进化水平的生物体内。关于各种生物体内 TTX 的来源, 长期以来就是一个有争议的问题。目前, 大部分文献报道认为 TTX 来自细菌, 其它有毒生物是通过食物链来吸

基金项目: 国家自然科学基金(30571426)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-532-82898746; E-mail: rcyu@ms.qdio.ac.cn

作者简介: 王晓杰(1979-), 女, 山东龙口人, 博士研究生, 海洋生态及环境毒理学。E-mail: jtiexw@163.com

收稿日期: 2007-11-29; 修回日期: 2008-03-24

收和累积由细菌所产生的 TTX^[2,3]。但也有研究发现一些生物自身也能够产生 TTX^[4,5]。目前,对于生物体内 TTX 的合成途径和产生机制的认识仍不够清楚。最新的研究发现了与河豚鱼体内 TTX 含量密切相关的新基因^[6],但仍不清楚它们在生物体内 TTX 累积或合成中所起的作用。

为探明织纹螺体内 TTX 的来源,在江苏盐城曾发生中毒事件的射阳盐场采集了织纹螺,并从织纹螺及其生活环境中分离了细菌,在实验室内培养后,对部分菌株进行了毒性测试及初步的种类鉴定。为探讨织纹螺体内 TTX 的可能来源、提出相应的预防管理措施提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 织纹螺和细菌样品:于 2006 年 6 月 13 日和 19 日,分别在江苏盐城射阳盐场现场采集活体织纹螺,并采集采样点的泥样和水样,放入无菌的玻璃瓶内,经 1 h 冷藏运回实验室,立即进行细菌分离。对采集织纹螺样品的种类鉴定参照有关文献资料进行^[7]。

1.1.2 主要试剂和仪器:实验中用到的主要试剂包括:用于细菌培养的蛋白胨、细菌酵母粉、植物蛋白胨和琼脂(BBI);用于河豚毒素提取的甲醇和二氯甲烷(Merck);用于 TTX 定量测定的酶联免疫检测试剂盒(北京中卫食品卫生科技公司);用于细菌基因组 DNA 抽提的 UNIQ-10 抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司);用于 PCR 扩增的 TaqDNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP 和 Marker(DL2000)等(大连 TaKaRa 公司);实验中用到的主要仪器包括:光照培养箱和恒温摇床(哈尔滨东联电子仪器有限公司)、离心机(Sigma)、超声波细胞粉碎机 JY96-(宁波新芝科器研究所)、旋转蒸发器(RE-52A,上海亚荣生化仪器厂)、酶标仪(EMax)、PCR 仪和凝胶成像仪(BIO-RAD);

1.2 细菌的分离和培养

采用改进的 ORI 培养基进行细菌分离培养^[8]。在无菌条件下,用无菌海水清洗织纹螺体表,清洗水直接涂布在 ORI 琼脂培养基上。采集的水样也直接涂布在培养基上。取少量泥样放于无菌平板中,加入少量无菌海水,混匀,取上清涂布在培养基上。解剖织纹螺,将其软体组织分为三部分:腹足,消化腺,

其他组织(包括头、口、鳃等组织)。在各组织中加入 10 倍体积的无菌海水,匀浆。再将匀浆液经梯度稀释,涂布在培养基上。在 20 条件下培养 7 d 后,挑取不同形态的菌落,经反复平板划线得到纯菌株。

1.3 毒性测试

1.3.1 织纹螺毒性测定:用于毒性测定用的织纹螺样品是参照国际公职分析化学家联合会(AOAC)推荐的麻痹性贝毒(PSP)毒性测试中的提取方法进行制备^[9],先前的实验表明该方法可以用于织纹螺的毒性测定。

织纹螺毒性测试采用小鼠腹腔注射法,具体过程参照台湾学者黄登福等建立的测试方法^[10]。样品毒性采用小鼠单位(mouse unit, MU)表示,1 MU 表示能够在 30 min 内杀死体重 20 g 小鼠(ICR 品系)所需的平均毒素量,大致相当于 0.18 μ g TTX 的毒性。

1.3.2 细菌毒性测试:在两次分离的细菌中,各随机挑取 7 个菌株采用 400 mL 液体培养基进行培养,并收集细胞^[11]。每升培养基溶液中含有 5 g 蛋白胨、5 g NaCl,加入蒸馏水,用 NaOH 调节至 pH 值 7.2 后,定容至 1 升^[12]。

在收集的细菌中加入 2 mL 酸化甲醇水,超声破碎 10 min,在 20 下 3700 g 离心 15 min,取上清液。向沉淀中加入 2 mL 酸化甲醇水重复提取 1 次。合并提取液,在 45 下旋转蒸发至干。以 2 mL 0.05 mol/L 乙酸溶液溶解,加入等体积二氯甲烷脱脂后,将含有毒素的水相吸出,在 13200 \times g 转速下离心 30 min,得到的上清即为毒素粗提液,用于 TTX 毒素检测。每一样品设置 3 个重复,测定结果的平均值用于 TTX 毒素含量的计算。

细菌中 TTX 的检测采用 TTX 定量酶联免疫检测试剂盒。试剂盒应用 TTX 单克隆抗体,通过固相酶联免疫吸附原理,采用直接竞争 ELISA 法进行测定。具体测定步骤可参考试剂盒说明。

1.4 细菌种类分析

通过细菌 16S rDNA 部分序列的测定,对有毒菌株进行种类分析。采用 UNIQ-10 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株的 DNA。用于 PCR 扩增的引物为细菌 16S rDNA 全长通用引物,8f: 5'-AGAGT-TTGATCMTGGCTCAG-3' 和 1492r: 5'-TACGGY-TACCTTGTTACGACTT-3'^[13]。PCR 反应体系(20 μ L): 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μ L,

dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 1.6 μL, 引物(10 μmol/L) 各 0.1 μL, 模板 DNA 1 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.12 μL, 重蒸水 13.48 μL。PCR 反应条件为: 94 预变性 10 min; 接 94 变性 1 min, 57 复性 1 min, 72 延伸 2 min, 总计 25 个循环; 最后 72 温育 10 min。PCR 扩增产物直接交送上海生工生物工程技术有限公司, 自 8f 端进行一个反应的序列测定。

将获得的序列应用 BLAST 程序与数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中的已有的细菌 16S rDNA 序列进行相似性比较分析, 并据此对目标菌株进行初步的种类鉴定^[14]。

2 结果

2.1 织纹螺种类鉴定与毒性测试结果

通过现场观察发现, 江苏盐城射阳盐场的织纹螺为半褶织纹螺 (*Nassarius semiplicatus*)。半褶织纹螺区别于其他种类织纹螺的主要形态特征为: 螺旋部呈圆锥形, 体螺层较大, 基部收缩; 壳顶光滑, 其余壳面具有多条纵肋, 只有在体螺层背部右侧纵肋光滑不显。

经小鼠生物测试, 2006 年 6 月 13 日和 19 日采集织纹螺的毒性分别为: 247 MU 和 270 MU/100g 组织(湿重), 毒性较低。

2.2 细菌毒性测试

应用试剂盒所附带的 TTX 标准品制作了直接竞争 ELISA 法测定 TTX 的标准工作曲线。以不同浓度 TTX 标准溶液的吸光度值(A_1)与空白溶液(未添加 TTX 标准品)吸光度值(A_0)的比值为纵坐标, 所对应的 TTX 标准溶液浓度 (ng/mL) 的对数值为横坐标, 得到了一条线性相关的标准工作曲线和相应的线性拟合方程(图 1)。样品中的 TTX 的含量通过拟合方程计算得到。

细菌毒性测试结果如表 1 所示。将 6 月 13 日和 6 月 19 日采集的样品分别标记为 1 组和 2 组, 在水、泥、及织纹螺的体表、腹足、消化腺、螺体其它部分分离的细菌分别标记为 W、E、S、M、D、R。在分离的 1 组和 2 组细菌中各随机挑出 7 株进行毒性检测, 其中分别有 3 株和 6 株检测结果呈现阳性, 阳性菌株占到分析菌株的 64%。在织纹螺体内及其生活环境中均分离到了阳性产毒菌株。阳性菌株分别为 1W3、1D7、1R8、2W7、2E2、2S4、2M6、2D1、2R6, 检测到的 TTX 毒素含量约在 20-100 ng/g。其中毒性

最强的菌株为 2E2, 毒素含量达 96 ng/g。

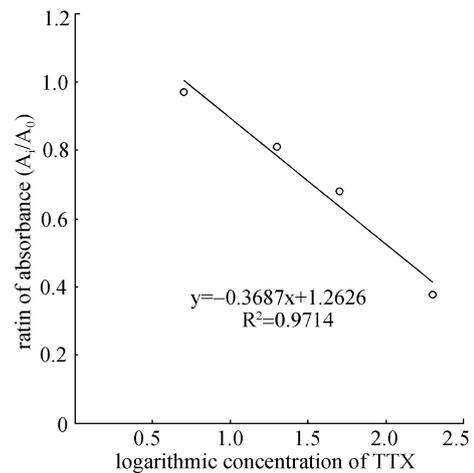


图 1 应用 ELISA 方法分析河豚毒素的标准工作曲线
Fig. 1 The calibration curve established for tetrodotoxin analysis with the ELISA method

表 1 河豚毒素产毒细菌的来源及毒性

Table 1 The origin and toxicity of TTX-producing bacteria

Bacterial strains	Isolation origin	Toxicity/(ng/g)
1W3	seawater	15 ± 2
1D7	Digestive gland of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	54 ± 3
1R8	The rest part of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	45 ± 5
2W7	seawater	30 ± 2
2E2	Marine sediment	96 ± 6
2S4	Surface of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	23 ± 2
2M6	Muscle of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	39 ± 4
2D1	Digestive gland of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	38 ± 6
2R6	The rest part of snail (<i>N. semiplicatus</i>)	88 ± 7

2.3 产毒细菌种类分析

对于检测到的阳性产毒菌株, 应用提取的 DNA 模板, 进行 16S rDNA 全长(约 1500 bp)的 PCR 扩增。扩增产物自 5 端进行一个反应的测序, 得到 16S rDNA 部分序列(约 700 bp), 通过 BLAST 程序与数据库中已有序列的对比, 对产毒菌株的种类进行了初步分析, 结果如表 2 所示。分离得到的 9 个阳性菌株与 5 个属的细菌相似性较高, 它们分别是动球菌属 (*Planococcus* sp.) (1 株)、希瓦氏菌属 (*Shewanella* sp.) (3 株)、发光杆菌属 (*Photobacterium* sp.) (1 株)、海单胞菌属 (*Marinomonas* sp.) (1 株)、弧菌属 (*Vibrio* sp.) (3 株), 其中毒性最强的 2E2 号菌株与希瓦氏细菌相似性最高, 达到 99%。

表 2 河豚毒素产毒细菌的种类分析
Table 2 Identification of TTX-producing bacteria

Bacterial strains	Accession No.	Closest relative (Accession No.)	Identity/%
1W3	EU281134	<i>Planococcus</i> sp. (EF471920.1)	97
1D7	EU281136	<i>Shewanella</i> sp. (AY690681.1)	99
1R8	EU281142	<i>Photobacterium phosphoreum</i> (AY292916.1)	99
2W7	EU281141	<i>Marinomonas</i> sp. (EF382679.1)	99
2E2	EU281138	<i>Shewanella</i> sp. (AY69081.1)	99
2S4	EU281139	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (BA000032.2)	99
2P6	EU281135	<i>Shewanella</i> sp. (DQ309046.1)	96
2D1	EU281137	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (EU077545.1)	99
2R6	EU281140	<i>Vibrio</i> sp. (DQ978992.1)	98

3 讨论

2003年6月12日,盐城射阳盐场东沙港地带发生一起食用织纹螺中毒事件,中毒2人,死亡1人。经形态学鉴定,肇事螺为半褶织纹螺,毒性约20000 MU/100g。经液-质联用分析后确认 TTX 及其衍生物是织纹螺中主要的毒素成分^[1,15]。本实验室于2006年5月至8月在该地区进行连续调查分析,发现该地区的织纹螺主要为半褶织纹螺,经小鼠法测试毒性范围为200~300 MU/100g 或无毒。本实验中,2006年6月13日和19日在盐城采集织纹螺的毒性分别为:247 MU 和 270 MU/100g 组织(湿重)。与日本法定的河豚鱼食用安全标准 1000 MU/100g 相比,该两批织纹螺的毒性均属于低毒。若食用量少,一般不会出现不良反应。在我国沿海常见的织纹螺种类有:纵肋织纹螺(*Nassarius nariciferus*)、红带织纹螺(*Nassarius succinctus*)、半褶织纹螺、西格织纹螺(*Nassarius siquinjorensis*)、习见织纹螺(*Nassarius dealbatus*)等^[7]。郑典元于2003年和2004年在连云港不同海滩采集半褶织纹螺及其它螺类,发现在相同的生态环境下,半褶织纹螺的毒性较其它螺高,并认为这可能与半褶织纹螺有较高的富集能力有关^[16]。而张农等通过对每年上百个织纹螺样品毒素检测分析后发现,织纹螺的毒性与其种类有重要的关系,并因此将织纹螺分为有毒织纹螺、无毒织纹螺及介于以上两者之间的织纹螺。根据这一分类原则,半褶织纹螺属于第三类,该螺在大多数情况下无毒,但因季节和栖息地不同,有时会有毒^[17]。考虑到半褶织纹螺毒性的不稳定性,因此要加强对沿海群众的健康宣传教育,并要求沿海居民不得采集和食用半褶织纹螺。

在过去很长一段时间里,人们认为 TTX 是河豚鱼特有的一种毒性物质。直到1964年,从一种蝶螺

体内也检测到 TTX^[18],才改变这种说法。随后的研究证实,TTX 存在于一系列不同进化水平的海洋生物和少量的两栖动物体内。正是由于 TTX 在生物界的广泛分布, Mosher 等提出了这样一个观点:在含有 TTX 的生物体内可能共存着产生 TTX 的微生物^[19]。随后的研究为该观点提供了实验例证。1986年在花纹爱洁蟹(*Atergatis floridus*)中分离得到四株产 TTX 的弧菌^[12, 20]。以后又在其他含毒生物体及其生活环境中分离得到了大量产 TTX 的微生物。有学者从苏格兰沿岸水域中分离了500多株细菌,其中37%的菌株能够产生 TTX 等具有钠离子通道阻断作用的毒素。实验发现,细菌只在稳定期才会产生 TTX,表明 TTX 是细菌的次级代谢产物^[11]。但是,对于细菌产生 TTX 的机制目前仍然没有清楚的认识。

本实验中,在织纹螺体内及其生活环境中均分离得到了能够产生 TTX 的细菌,通过16S rDNA 部分序列的测序结果发现,它们与5个属的细菌在遗传序列信息上比较相近,分别是弧菌属、希瓦氏菌属、动球菌属、海单胞菌属和发光杆菌属。在这5个属的细菌中,只有弧菌属和希瓦氏菌属的菌株有过产毒的报道,而动球菌属、发光杆菌属和海单胞菌属的细菌尚未有产毒报道,但这3个属的细菌广泛存在于海洋环境和海洋生物体内。弧菌是产生 TTX 的主要微生物,目前已在扇蟹(*Atergatis floridus*)^[12, 20]、河豚鱼(*Takifugu vermicularis vermicularis*)^[21]、海星(*Astropecten polycaanthus*)^[22]、章鱼(*Octopus maculosus*)^[23]等生物体内及深海沉积物^[24]中分离得到了能够产生 TTX 的弧菌。从河豚鱼(*Takifugu niphobles*)的肠道内也分离到了能够产生 TTX 的希瓦氏菌^[25]。随着研究的深入,有可能分离到更多种类的能够产生 TTX 的微生物。

本实验从织纹螺体内及其生活环境中分离的产毒

细菌毒素含量普遍较低。在以往的研究中,从两种河豚鱼(*Fugu vermicularis vermicularis* 和 *Takifugu alboplumbeus*)中分离到的产 TTX 的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),在 500 mL 培养液中分别培养 10 d 和 7 d 后,收集得到的细菌进行小鼠生物测试,毒性分别为 78.3 MU 和 3 MU^[21, 26]。而本实验中分离的产毒菌株,在 400 mL 培养液中培养 7 d 后,收集得到的细菌毒性最高只有 0.4 MU(采用 ELISA 法测试,TTX 毒素含量最高为 96 ng/g,细菌湿重约 0.8 g)。与射阳盐场曾发现的高毒织纹螺毒性(约 200 MU/g)相比,培养细菌的毒素含量也非常低(<0.5 MU/g),况且经扩大培养后的细菌数量远远高于织纹螺体内细菌的实际数量。那么,织纹螺体内含量如此之高的 TTX 是如何得来的?这可能有几个方面的原因:首先,我们目前还无法对织纹螺及其生活环境中的所有的微生物进行分离培养,可能还有高毒性的菌株没有被分离到,而且细菌的培养条件与其在自然环境中的生存环境也相差较大,因此,有可能低估了微生物产毒的作用;其次,在织纹螺体内也可能存在有利于其富集 TTX 的生物学机制,能够富集低浓度的 TTX 而使体内毒素含量达到较高的水平;最后,还不能排除织纹螺体内的毒素是其自身产生的可能性。这些都需要更多的研究工作来予以阐明。

本文采用了定量酶联免疫检测试剂盒对细菌样品中的 TTX 进行检测,试剂盒使用 TTX 的单克隆抗体^[27],具有较高的特异性。采用的直接竞争 ELISA 测定方法又具有简便快捷、灵敏度高等优点,而却无需特殊设备、可满足现场工作的需要。但是,由于生物学方法本身的局限性,对于细菌的产毒特征还需要通过液-质联用等化学分析方法进行进一步的确认。

4 结论

本文从含有 TTX 的半褶织纹螺体内及其生活环境中分离得到了部分细菌,应用 ELISA 方法首次检测到了织纹螺及其生活环境中存在产毒的细菌,并对产毒细菌进行了初步的种类分析,这一实验结果说明织纹螺中的 TTX 有可能与其体内及其生活环境中的细菌有关,有必要进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 于仁成,周名江,李爱峰,等. 中国沿海两例食用织纹螺中毒事件中织纹螺体内毒素分析. 中国水产科学(*Journal of Fishery Sciences of China*), 2007, 14(5): 801-806.

- [2] Carroll S, McEvoy EG, Gibson R. The production of tetrodotoxin-like substances by nemertean worms in conjunction with bacteria. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 2003, 288: 51-63.
- [3] Wu ZL, Xie LP, Xia GL, et al. A new tetrodotoxin-producing actinomycete, *Nocardopsis dassonvillei*, isolated from the ovaries of puffer fish *Fugu rubripes*. *Toxicon*, 2005, 45: 851-859.
- [4] Matsumura K. Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos. *Environmental toxicology and pharmacology*, 1998, 6: 217-219.
- [5] Cardall BL, Brodie Jr. ED, Brodie III ED, et al. Secretion and regeneration of tetrodotoxin in the rough-skin newt (*Taricha granulosa*). *Toxicon*, 2004, 44: 933-938.
- [6] Lee JH, Kondo H, Sato S, et al. Identification of novel genes related to tetrodotoxin intoxication in pufferfish. *Toxicon*, 2007, 49: 939-953.
- [7] 齐仲彦, 马繡同, 楼子康, 等. 中国动物图谱: 软体动物(第二册). 科学出版社, 1983, 98-103.
- [8] Simidu U, Tsukamoto K. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family *Vibrionaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50: 781-790.
- [9] Williams S. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, 1984, Inc.: 344-345.
- [10] Hwang DF, Jeng SS. Bioassay of tetrodotoxin using ICR mouse strain. *Journal of the Chinese Biochemical Society*, 1991, 20(2): 80-86.
- [11] Gallacher S, Brikbeck TH. Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetraodonis*. *Applied and environmental microbiology*, 1993, 59 (11): 3981-3983.
- [12] Noguchi T, Jeon JK, Arakawa O, et al. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a xanthid crab, *Atergatis floridus*. *J Biochem*, 1986, 99: 311-314.
- [13] Lane DJ, Pace B, Olson GJ, et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 1985, 82: 6955-6959.
- [14] Chen JC, Banks D, Jarret RL, et al. Use of 16S rDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. *Current microbiology*, 2000, 40: 29-33.
- [15] 顾振国, 于仁成. 食用半褶织纹螺中毒的调查报告. 江苏预防医学(*Jiangsu Journal of Preventive Medicine*), 2004, 15(1): 35.
- [16] 郑典元. 不同海滩栖息地半褶织纹螺毒力调查. 中国公共卫生(*Chinese Journal of Public Health*), 2006, 22(10): 1262.
- [17] 张农, 刘海新, 苏捷, 等. 织纹螺及其毒性. 中国水产(*China Fisheries*), 2007, 3: 72-73.
- [18] Mosher HS, Fuhrman FA, Buchwald HD, et al. Tarichatoxin-tetrodotoxin: a potent neurotoxin. *Science*, 1964, 144:

- 1100–1110.
- [19] Mosher HS, Fuhrman FA. Occurrence and origin of tetrodotoxin, in: Ragelis, E.P. (Ed.), *Seafood Toxins*. American Chemical Society, Washington, DC, 1984, 333–344.
- [20] Noguchi T, Arakawa, O, Daigo, K., *et al.* Local differences in toxin composition of a xanthid crab *Atergatis floridus* inhabiting Ishigaki Island, Okinawa. *Toxicon*, 1986, 24: 705–711.
- [21] Noguchi T, Hwang DF, Arakawa O, *et al.* *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestine of the fish *Fugu vermicularis vermicularis*. *Mar Biol*, 1987, 94: 625–630.
- [22] Narita H, Matsubara S, Miwa N, *et al.* *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1987, 53 (4): 617–621.
- [23] Hwang DF, Arakawa O, Saito T, *et al.* Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus*. *Mar Biol*, 1989, 100: 327–332.
- [24] Do HK, Kogure K, Simidu, U. Identification of deep-sea-sediment bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56 (4): 1162–1163.
- [25] Matsui T, Taketsugu S, Kodama K, *et al.* Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish *Takifugu niphobles*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989, 55 (2): 2199–2203.
- [26] Yu CF, Yu PHF, Chan PL, *et al.* Two novel species of tetrodotoxin-producing bacteria isolated from toxic marine puffer fishes. *Toxicon*, 2004, 44: 641–647.
- [27] 宫慧芝, 计融, 江涛, 等. 河豚毒素单抗 ELISA 检测试剂盒的研制. *中国公共卫生* (*Chin J Public Health*), 2005, 21(12): 1423–1424.

Toxicity screening and identification of bacteria isolated from snails *Nassarius semiplicatus* and their habitat

Xiaojie Wang^{1,2}, Rencheng Yu^{1*}, Xuan Luo^{1,2}, Mingjiang Zhou¹, Jinjin Shen³, Zhenguo Gu³

¹Key Laboratory of Marine Ecology and Environment Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

²Graduate school, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

³Yancheng Municipal Centers for Disease Control and Prevention, Yancheng 224002, China

Abstract: [Objective] Tetrodotoxin and its analogues (TTXs) were responsible for the poisoning incidents associated with snail *Nassarius* spp. We studied bacteria isolated from toxic snails as well as their habitat to probe into the relationship between bacteria and toxicity of nassariid gastropod. **[Methods]** Two snail samples were collected from Sheyang, Jiangsu Province on June 13 and 19, 2006, and the toxicity of the snail samples was tested with mouse bioassay method. Bacteria were isolated from the snail samples and from their habitat. A part of isolated bacteria were then cultured in the lab, and TTX in bacteria were screened with an ELISA method. **[Results]** The snails collected were identified as *Nassarius semiplicatus*, and the toxicity of the 2 samples were 247 mouse unit (MU) and 270 MU / 100g tissue (wet weight), respectively. TTX was detected in 9 strains among the 14 strains of bacteria isolated from the snail samples and their habitat. TTX content in the toxic strains was very low, which ranged from 15 ng/g to 96 ng/g. Partial of the 16S ribosomal DNA (rDNA) of the toxic strains were then sequenced after PCR amplification, and the toxic strains of bacteria were tentatively identified based on the alignment of these sequences with published data. Toxic strains were closely affiliated with *Vibrio*, *Shewanella*, *Planococcus*, *Marinomonas*, *Photobacterium*. **[Conclusion]** These findings suggested that TTX-producing bacteria may play an important role in TTX production or accumulation in nassariid gastropod.

Keywords: *Nassarius* spp.; tetrodotoxin; bacteria; ELISA; 16S rDNA

Supported by the National Science Foundation of China (30571426)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-532-82898590; E-mail: rcyu@ms.qdio.ac.cn

Received: 29 November 2007/ Revised: 24 March 2008