

半褶织纹螺体内的河豚毒素及菌群结构分析

陈小红¹, 沈晓娜², 许贻斌¹, 许翠娅¹, 郑惠东¹

1. 福建省水产研究所/福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013

2. 福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350117

摘要: 河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 是一种强毒性生物毒素, 在自然界中分布较广。为探究半褶织纹螺 (*Nassarius semiplicatus*) 体内 TTX 的可能细菌性来源, 采用液相色谱-串联质谱法分析福建海域半褶织纹螺体内的 TTX 及同系物, 并利用高通量测序分析含和不含 TTX 的织纹螺的细菌群落结构。结果显示, 含 TTX 织纹螺组 (LTN 组) 中 TTX 的质量分数为 402~644 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 同时检测到 trideoxyTTX、dideoxyTTX、deoxyTTX 等 3 种同系物; 不含 TTX 织纹螺组 (NTN 组) 检测到微量的 dideoxyTTX。高通量测序结果显示, LTN 组的群落丰富度显著高于 NTN 组 ($p<0.05$); 2 组的主要优势菌门为变形菌门; LTN 组的主要优势菌属包含弧菌属 (*Vibrio*)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) 等产 TTX 相关菌, NTN 组包含假交替单胞菌属、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)。弧菌属、嗜冷杆菌属等 17 个差异菌属在 LTN 组中的相对丰度大于 NTN 组 ($p<0.05$)。2 组的菌群 KEGG 功能组成相似, 以氨基酸代谢、碳水化合物代谢等为主。结果表明, 含或不含 TTX 的半褶织纹螺均存在产 TTX 相关菌, 弧菌属、嗜冷杆菌属更容易在含 TTX 半褶织纹螺中富集, 这些菌属可能与半褶织纹螺体内 TTX 同系物或前体物质的生物合成有关。

关键词: 半褶织纹螺; 河豚毒素; 菌群结构; 高通量测序; 液相色谱-串联质谱

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Analysis of tetrodotoxin and microbial community structure in *Nassarius semiplicatus*

CHEN Xiaohong¹, SHEN Xiaona², XU Yibin¹, XU Cuiyi¹, ZHENG Huidong¹

1. Fujian Fishery Research Institute/Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China

2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China

Abstract: Tetrodotoxin (TTX) is a potent marine toxin, found in a great variety of marine and some terrestrial species. In order to explore the potential bacterial sources of TTX in *Nassarius semiplicatus*, we collected its TTX and analogues from Fujian Province and analyzed them by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Besides, we compared the microbial communities of TTX-bearing and non-TTX-bearing by using high-throughput sequencing technology. The results show that the contents of TTX in TTX-bearing *N. semiplicatus* (LTN) were 402~644 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. TrideoxyTTX, dideoxyTTX and deoxyTTX were detected. TTX and other analogues were not detected in non-TTX-bearing *N. semiplicatus* (NTN) except dideoxyTTX. The results of high-throughput sequencing show that the community richness of LTN was significantly higher than that of NTN ($p<0.05$). The microbial communities of LTN and NTN were dominated by Proteobacteria. TTX-producing bacteria, including *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* and *Psychrobacter*, were the dominant bacteria in LTN, while *Pseudoalteromonas* and *Shewanella* in NTN. The significant difference analysis shows that the relative abundance of 17 differential genera in LTN,

收稿日期: 2024-10-08; 修回日期: 2024-12-24

基金项目: 福建省省属公益类科研院所基本科研专项 (2022R1013001)

作者简介: 陈小红 (1987—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为海洋生物毒素与微生物。E-mail: cxb870319@163.com

including *Vibrio* and *Psychrobacter*, etc., were significantly higher than that of NTN ($p < 0.05$). The KEGG functional composition of the intestinal flora of LTN and NTN were similar. The main metabolic pathways were amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and so on. The results show that TTX-producing bacteria can exist in both LTN and NTN; *Vibrio* and *Psychrobacter* are more enriched in LTN. These TTX-producing bacteria may be related to the biosynthesis of TTX analogues and precursors in *N. semiplicatus*.

Keywords: *Nassarius semiplicatus*; Tetrodotoxin; Microbial community; High-throughput sequencing; LC-MS/MS

织纹螺 (*Nassarius* spp.) 是一类海洋腹足类动物, 为腐食性, 广泛分布于热带、亚热带及温带地区的潮间带及海底, 在中国主要分布于江苏、浙江、福建、广东的沿海区域^[1-2]。织纹螺味道鲜美, 深受包括中国在内的部分亚洲国家居民的喜爱。但近几十年来, 食用织纹螺中毒事件时有发生, 甚至出现人员死亡, 引起了有关部门的高度重视。

随着检测技术的不断发展, 织纹螺的主要致毒成分基本被确认为河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX) 及其同系物^[1]。TTX 为氨基全氢喹唑啉化合物, 是一种典型的非蛋白类神经毒素, 能造成神经麻痹, 严重时患者会因为中枢神经麻痹导致呼吸停止而死亡^[3]。关于 TTX 的来源一直颇具争议, 通常认为可能有内源性和外源性 2 种。内源性来源主要指自身产生的毒素, 外源性来源则包括了食物链累积及微生物产生的毒素^[4]。由于织纹螺是腐食性动物, 因此可能摄食环境中的有毒动物尸体或有毒藻类, 导致毒素在体内蓄积^[2]。此外, 随着从海洋生物及其生活环境中分离得到的产 TTX 细菌的种类和数量不断增加, 产 TTX 细菌被认为可能是海洋生物体内 TTX 的重要来源之一^[5]。织纹螺作为一类含 TTX 的生物, 其体内的毒素来源也可能和微生物有关。

当前, 已报道的产 TTX 细菌大多局限于实验室可培养的细菌, 推测还有不可培养的细菌可进行 TTX 的生物合成^[6]。利用高通量测序技术对含 TTX 生物中不可培养的微生物进行研究, 有助于深入认识 TTX 的积累和来源问题。Biessy 等^[7]利用 16S rRNA 测序技术对含 TTX 和不含 TTX 双壳贝类的细菌群落进行比较, 提出弧菌属 (*Vibrio*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 可能是双壳贝类中 TTX 的细菌来源。Melnikova 和 Magarlamov^[8]通过分析纽虫的群落结构发现, 与不含 TTX 的纽虫相比, 产 TTX 细菌更容易在含 TTX 的纽虫中积累。但目前关于织纹螺的细菌群落结构研究尚未见报道。基于此, 本研究以较为常见的半褶织纹螺 (*N. semiplica-*

tus) 为研究对象, 采用液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法分析半褶织纹螺体内的 TTX 及其同系物, 利用高通量测序技术比较含 TTX 和不含 TTX 织纹螺的菌群结构差异, 从微生物的角度探讨半褶织纹螺体内毒素的可能来源, 以期对其他含 TTX 生物的微生物学研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

本研究于 2023 年 6—7 月在福建省莆田市秀屿区下房海域采集半褶织纹螺, 共采集 6 次, 代表 6 个实验组。考虑到半褶织纹螺个体较小, 从每个实验组中挑出大小均一的 100 只螺作为 1 组样本, 共 6 组。每组样本随机取 10 只, 用游标卡尺、天平分别测量其壳长、体质量。每组螺先用 75% (φ) 乙醇擦拭表面, 接着用灭过菌的开壳工具取其软组织于无菌离心管中, 再用消过毒的匀浆机匀浆, 最后于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。匀浆样品用于螺体内的毒素成分和菌群结构分析。

1.2 TTX 及其同系物的测定

采用液相色谱-串联质谱法对半褶织纹螺体内的 TTX 及其同系物进行检测。TTX 的质量分数根据标准曲线进行定量, TTX 同系物因缺少标准品只进行定性分析。前处理方法参照黄连琴^[9]的测定方法。色谱条件如下: TSKgel Amide-80 色谱柱 ($150 \times 2.0\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$); 流动相 A 为含 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵和 0.1% (φ) 的甲酸溶液, 流动相 B 为乙腈; 洗脱梯度为 $0\sim 2.0\text{ min}$ ($90\%\text{ B}$), $2.1\sim 6.0\text{ min}$ ($10\%\text{ B}$), $6.1\sim 8.0\text{ min}$ ($90\%\text{ B}$); 流速 $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样体积 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。质谱的离子源: ESI 正离子, 喷雾电压: $3\text{ }500\text{ V}$, 鞘气 40 Arb , 辅助气 15 Arb , 碰撞室压力 1.5 mTorr , 检测方式: 多反应监测模式 (MRM), 5 种目标化合物: trideoxyTTX (m/z , $272 > 254/162$)、dideoxyTTX (m/z , $288 > 270/224$)、deoxyTTX (m/z , $304 > 286/176$)、TTX (m/z , $320 > 302/162$)、oxoTTX (m/z , $336 > 318/178$)。

1.3 微生物多样性的测定

本研究 DNA 的提取、扩增及产物测序均委托上海生工生物工程有限公司完成。具体流程如下: 根据 OMEGA DNA 试剂盒方法提取样品的 DNA。以提取的 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因 V3—V4 区引物 (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGC AG-3', 805R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (30 μL): 2×Hieff Robust PCR Master Mix 15 μL, 上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 12 μL, 模板 1 μL。PCR 反应条件: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 25 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物使用 2% (w) 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 使用 Qubit 4.0 荧光定量仪进行文库浓度测定。构建好的文库通过 Illumina Miseq 平台进行高通量测序。

1.4 数据分析处理

对下机测序得到的双端序列数据, 首先去除引物接头序列, 再根据 PE reads 间的 overlap 关系, 将成对的 reads 拼接成 1 条序列, 然后按照 barcode 标签序列识别并区分样品得到各样本数据, 最后对各样本数据的质量进行质控过滤, 得到各样本的有效数据。

采用 Ribosomal database project (RDP) classifier 贝叶斯算法对 97% 相似度水平的操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTUs) 代表序列进行

分类学分析, 统计各样品在门和属水平上的群落组成。基于 OTUs 的分析结果, 采用 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数进行 Alpha 多样性分析。Chao1 指数越大, 表明群落丰富度越高; Shannon 指数越大或 Simpson 指数越小, 则表明群落多样性越高。基于加权和非加权距离进行主坐标成分分析 (Principal co-ordinate analysis, PCoA) 以及 Anosim 组间相似性分析。采用 STAMP 软件进行差异物种分析。采用 PICRUST 软件进行 KEGG 基因功能预测分析。采用 SPSS 22.0 软件对数据进行独立样本 *t* 检验分析, 显著性水平 α 设为 0.05。

2 结果

2.1 半褶织纹螺体内的 TTX 及其同系物

由于半褶织纹螺属于季节性有毒织纹螺, 其体内是否含 TTX 具有不确定性, 因此本研究选择织纹螺毒性高发的夏季进行样品采集。根据半褶织纹螺体内是否含 TTX, 分为不含 TTX 织纹螺组 (NTN 组) 和含 TTX 织纹螺组 (LTN 组) (表 1)。其中, NTN 组的平均壳长范围为 (1.62±0.16)~(1.74±0.20) cm, 平均体质量范围为 (0.59±0.10)~(0.71±0.14) g, TTX 质量分数均小于定量限 50 μg·kg⁻¹; LTN 组的平均壳长范围为 (1.42±0.04)~(1.55±0.07) cm, 平均体质量范围为 (0.41±0.03)~(0.49±0.08) g, TTX 质量分数范围为 402~644 μg·kg⁻¹。

表1 半褶织纹螺的壳长、体质量及其体内 TTX 的质量分数
Table 1 Shell length, body mass and TTX content of *N. semiplicatus*

采样日期 Sampling date	样品名称 Sample name	平均壳长 Average shell length/cm	平均体质量 Average body mass/g	TTX 质量分数 Mass fraction of TTX/(μg·kg ⁻¹)
2023-06-06	NTN-1	1.71±0.22	0.70±0.12	<50
2023-06-13	NTN-2	1.62±0.16	0.59±0.10	<50
2023-06-20	LTN-1	1.42±0.04	0.41±0.03	402
2023-06-27	LTN-2	1.47±0.04	0.44±0.05	644
2023-07-04	NTN-3	1.74±0.20	0.71±0.14	<50
2023-07-18	LTN-3	1.55±0.07	0.49±0.08	613

如图 1-a 所示, 由 TTX 标准品检测得到的标准曲线线性方程为 $y=719.1x-81.85$, 相关系数 r^2 为 0.999 8, 说明在 2~50 ng·mL⁻¹ 浓度范围内线性良好。LTN 组样品中检测到 trideoxyTTX、dideoxyTTX、deoxyTTX、TTX 共 4 种, 其中 tri-

deoxyTTX 的峰面积最大, deoxyTTX 和 TTX 次之, dideoxyTTX 最小 (图 1-c)。此外, 样品中 TTX 的出峰时间为 4.79 min, 与标准品出峰时间一致 (图 1-b), 样品中 TTX 同系物因缺少市售标准物质无法进行比较。NTN 组样品除检测到微量的

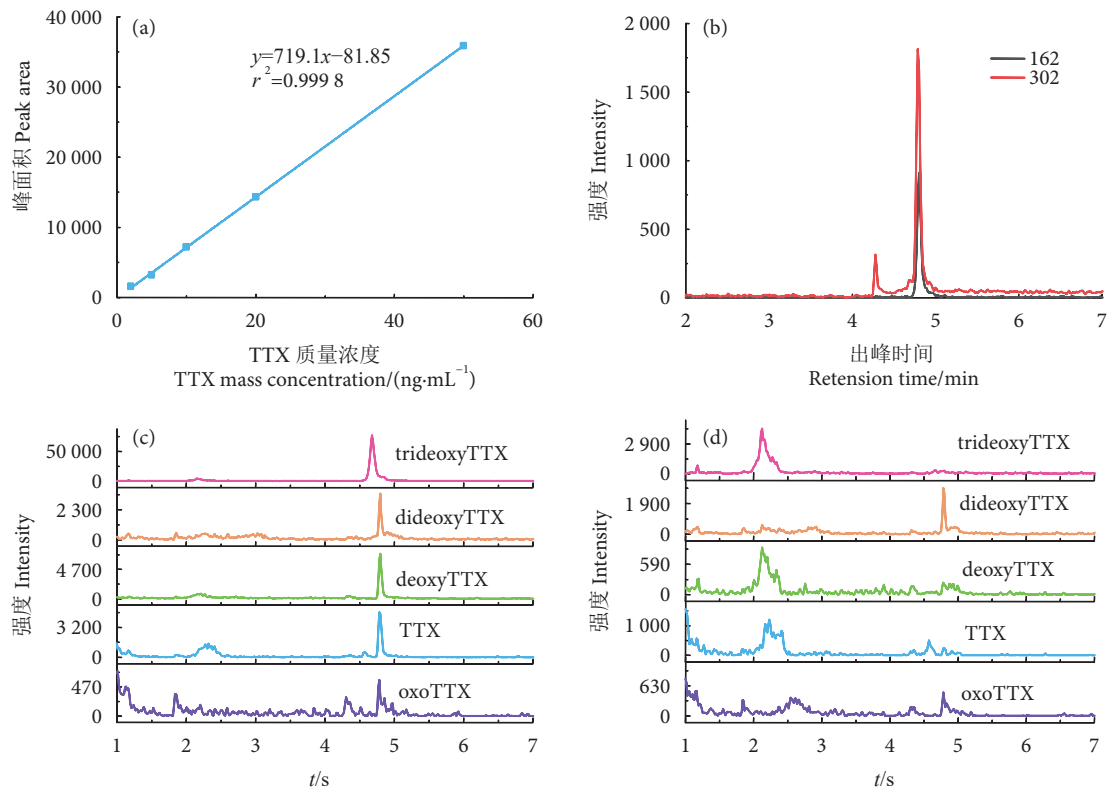


图1 标准曲线、标准品及部分样品的 LC-MS/MS 检测图谱

注: a. 标准曲线; b. 10 ng·mL⁻¹ TTX; c. LTN-1 色谱图; d. NTN-1 色谱图。

Fig. 1 Calibration curve of TTX, chromatogram map of TTX standards and some samples detected by LC-MS/MS

Note: a. Calibration curve; b. 10 ng·mL⁻¹ TTX; c. Chromatogram map of LTN-1; d. Chromatogram map of NTN-1.

dideoxyTTX 外, 未检测到 TTX 及其他 3 种同系物 (图 1-d)。

2.2 半褶织纹螺的菌群多样性分析

将测序得到的双端序列数据通过质控过滤得到各样本的有效数据。6 个实验组样品最终得到有效序列数 350 573 条, 平均序列长度为 418.89 bp。其

中 LTN 组共获得有效序列 181 114 条, 平均每个样品为 60 371 条; NTN 组共获得有效序列 169 459 条, 平均每个样品为 56 486 条。韦恩图 (图 2-a—2-c) 显示, 2 组共有 OTUs 935 个、门 26 个、属 479 个; 2 组特有的 OTUs、门、属的数目均无显著性差异 ($p>0.05$)。

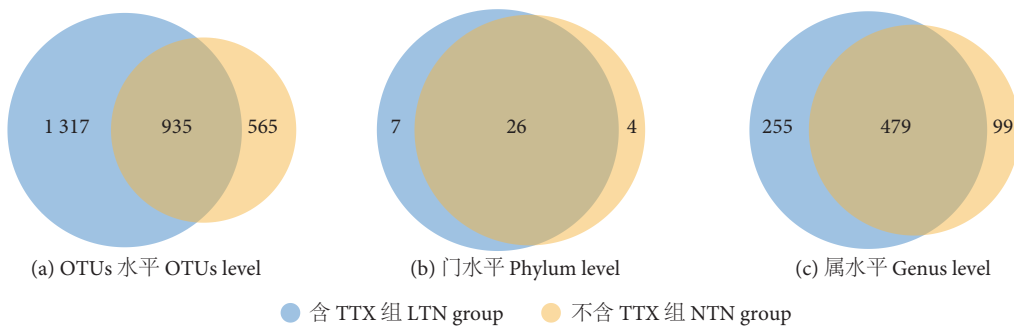


图2 基于 OTUs 水平、门水平、属水平的韦恩图

Fig. 2 Venn analysis of bacterial community based on OTUs, phylum and genus levels

如表 2 所示, LTN 组的有效 OTUs 数、Chao1 指数均显著高于 NTN 组 ($p<0.05$), 表明含 TTX 的半褶织纹螺的群落丰富度高于不含 TTX 的半褶织

纹螺。LTN 组的 Shannon、Simpson 指数与 NTN 组均无显著差异 ($p>0.05$), 表明含与不含 TTX 的半褶织纹螺的群落多样性无显著差异。

表2 Alpha 多样性指数
Table 2 Alpha diversity indexes

组别 Group	OTUs 数 OTUs number	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
含 TTX 织纹螺组 LTN group	1 300±160 ^a	1 355±153 ^a	4.08±0.24 ^a	0.07±0.02 ^a
不含 TTX 织纹螺组 NTN group	831±78 ^b	897±82 ^b	3.39±0.42 ^a	0.11±0.04 ^a

注：同列中不同字母间存在显著差异 ($p<0.05$)。
Note: Values with different letters within the same column are significantly different ($p<0.05$).

2.3 半褶织纹螺的菌群结构分析

门水平下 (图 3-a), LTN 组中相对丰度排名前五的菌门分别为变形菌门 (43.9%~67.5%)、弯曲菌门 (11.7%~15.6%)、螺旋体门 (2.54%~24.6%)、拟杆菌门 (5.75%~12.1%)、梭杆菌门 (3.18%~5.38%); NTN 组中相对丰度排名前五的菌门分别为变形菌

门 (19.3%~58.7%)、梭杆菌门 (12.7%~52.4%)、拟杆菌门 (11.0%~27.5%)、螺旋体门 (0.51%~33.4%)、弯曲菌门 (2.84%~6.23%)。2 组的优势菌门种类一致, 相对丰度无显著差异 ($p>0.05$)。此外, 蓝藻门在 LTN 组中的相对丰度 (0.93%~1.55%) 高于 NTN 组 (0.30%~0.90%), 但无显著差异 ($p>0.05$)。

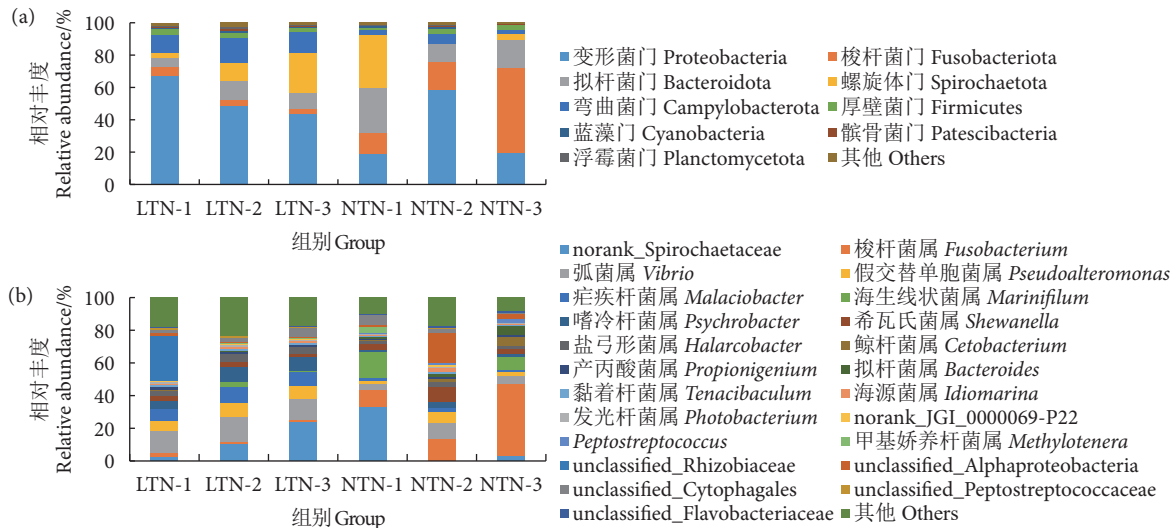


图3 门水平和属水平下半褶织纹螺的菌群结构
Fig. 3 Community structure of *N. semiplicata* on phylum and genus levels

属水平下 (图 3-b), LTN 组中相对丰度排名前五的已知优势菌属分别为弧菌属 (13.4%~15.2%)、norank_Spirochaetaceae (2.39%~24.0%)、疟疾杆菌属 (*Malaciobacter*, 7.27%~9.48%)、假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*, 6.15%~9.00%)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*, 4.95%~8.86%); NTN 组中相对丰度排名前五的已知优势菌属分别为梭杆菌属 (*Fusobacterium*, 10.6%~44.1%)、norank_Spirochaetaceae (0.28%~33.2%)、海生线状菌属 (*Marinifilum*, 0.10%~16.2%)、假交替单胞菌属 (3.67%~9.91%)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*, 3.35%~9.62%)。其中, LTN 组的弧菌属、疟疾杆菌属、嗜冷杆菌属的相对丰度显著高于 NTN 组 ($p<0.05$), 而梭杆菌属相对丰度显著低于 NTN 组 ($p<0.05$)。

2.4 含和不含 TTX 半褶织纹螺的菌群差异性分析

本研究采用非加权丰度指数和加权丰度指数进行 PCoA 分析, 其中非加权丰度指数主要关注 OTUs 存在与否, 加权丰度指数则考虑 OTUs 的丰度信息。在非加权丰度下 (图 4-a), 前 3 个主成分 (PCoA1、PcoA2、PCoA3) 的贡献率分别为 39.81%、21.10%、15.17%, 累计贡献率达到 76.08%; 在加权丰度下 (图 4-b), 前 3 个主成分贡献率分别为 50.38%、34.49%、8.04%, 累计贡献率达到 92.91%。说明在非加权与加权丰度下, 3 个主成分可代表所检测细菌群落的大部分信息。根据 Anosim 组间相似性分析结果, 非加权丰度下, $r^2=0.6296$, $p>0.05$; 加权丰度下, $r^2=0.8148$, $p>0.05$ 。虽然组间差异大于组内差异, 但均不显著, 说明含

和不含 TTX 的织纹螺的菌群结构总体上较为相似。

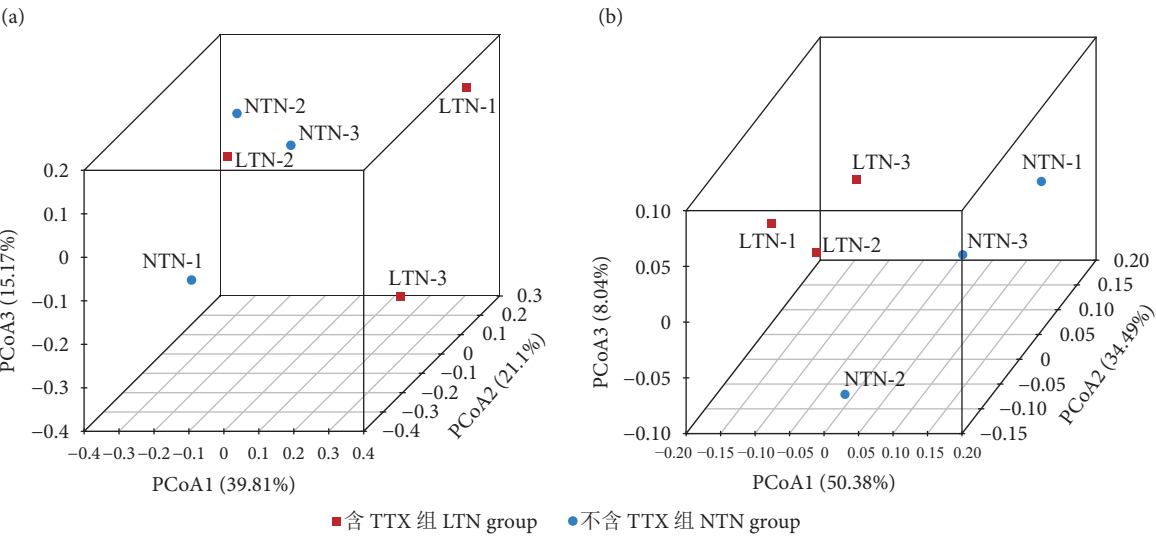


图4 基于 OTUs 的 PCoA 分析

注：PCoA 用来表示不同群体间的差异，样品距离越接近，表示物种组成结构越相似。

Fig. 4 PCoA analysis of bacterial community based on OTUs level

Note: PCoA represents the differences among different groups. The closer the sample distance is, the more similar the microbial community structure is.

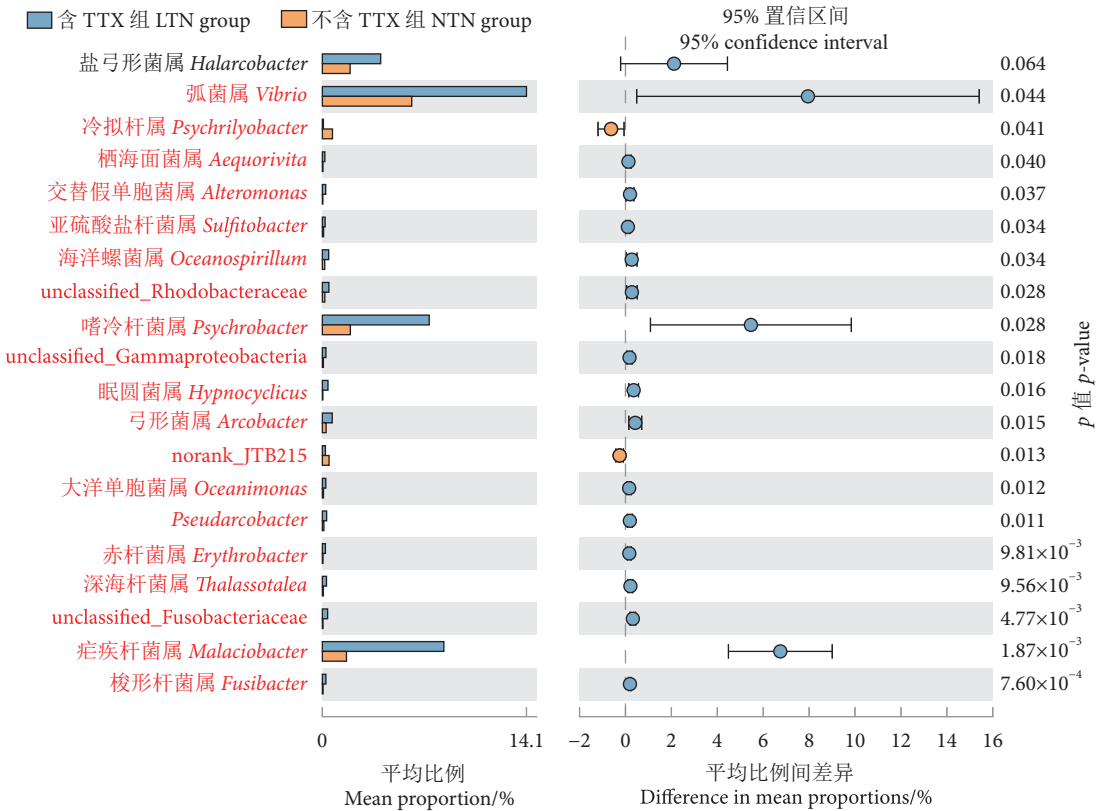


图5 属水平上的 STAMP 差异分析图

注：图的左边所示为不同物种分类在 2 组样本中的丰度比例；中间所示为 95% 置信度区间内，物种分类丰度的差异比例；最右边为 p 值， $p < 0.05$ 表示差异显著。红色字体的菌属表示显著差异物种，黑色字体的菌属表示非显著差异物种。

Fig. 5 STAMP analysis on genus level

Note: The left side of the figure shows the abundance ratio of different species classifications in the two groups of samples. The middle side of the figure shows the difference ratio of species classification abundance within the 95% confidence interval. The value on the right side is p value, $p < 0.05$ represents significant differences. The genus in red represent significant difference species, and the genus in black represents non-significant difference species.

度大于 0.2% 且 $p < 0.05$ 的差异菌属共 19 个, 其中有 17 个差异菌属在 LTN 组中的相对丰度高于 NTN 组, 相对丰度较高的差异菌属分别为弧菌属、疟疾杆菌属和嗜冷杆菌属。

2.5 基于 PICRUST 的菌群基因功能预测

通过对含和不含 TTX 的半褶织纹螺的菌群 KEGG pathway (level-2) 进行丰度组成分析。选择相对丰度前 20 的代谢通路进行分析 (图 6), 2 组织纹螺体内菌群的 KEGG 功能组成总体相似, 均无显著差异 ($p > 0.05$)。丰度相对较大的代谢通路为氨基酸代谢 [LTN 组: (13.40±0.41)%, NTN 组:

(12.50±0.63)%]、碳水化合物代谢 [LTN 组: (13.30±0.89)%, NTN 组: (12.90±0.13)%]、辅助因子和维生素代谢 [LTN 组: (12.50±1.39)%, NTN 组: (13.70±0.10)%]、萜类和聚酮类物质代谢 [LTN 组: (8.52±0.34)%, NTN 组: (10.20±1.24)%]; 丰度相对居中的代谢通路为外来生物的生物降解和代谢 [LTN 组: (7.43±2.29)%, NTN 组: (5.45±0.78)%]、类脂物代谢 [LTN 组: (5.82±0.23)%, NTN 组: (5.33±0.25)%]、能量代谢 [LTN 组: (5.58±0.13)%, NTN 组: (5.58±0.16)%]、复制和修复 [LTN 组: (5.15±0.67)%, NTN 组: (5.90±0.37)%]。

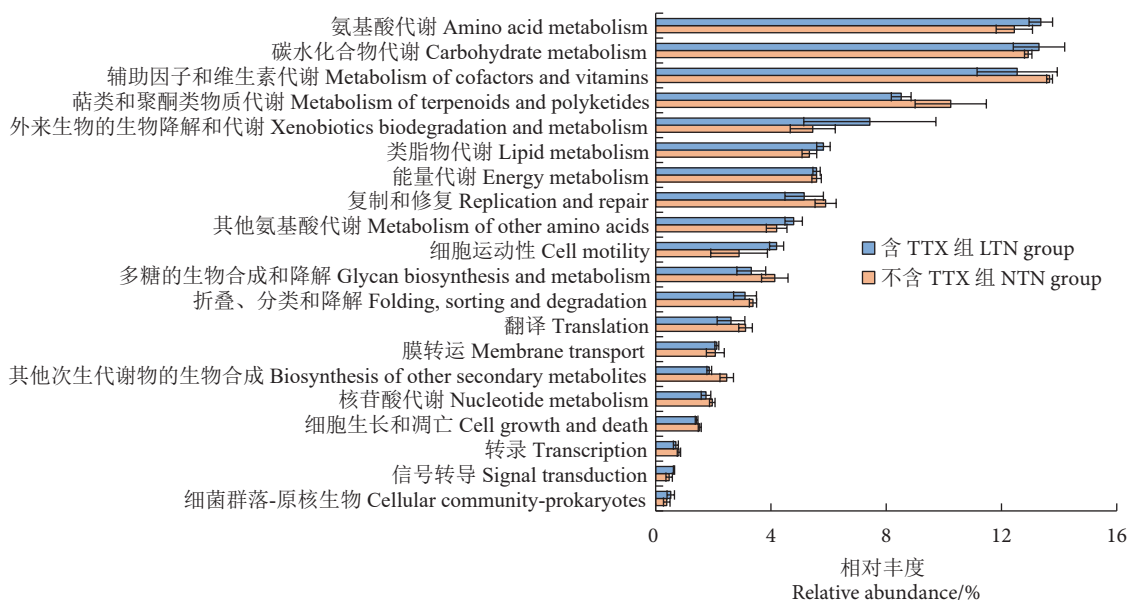


图6 基于 PICRUST 的菌群基因功能预测

Fig. 6 Genomic functional prediction of bacterial community by PICRUST

3 讨论

3.1 半褶织纹螺体内毒素成分分析

已有研究发现, 福建省的织纹螺毒性消长具有明显的季节性和地域性特征^[10], 本研究的半褶织纹螺采集于 2023 年夏季的福建省莆田市下房海域, 排除了季节性和地域性差异。采集到的含 TTX 的半褶织纹螺体内 TTX 质量分数介于 402~644 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 虽低于国内水产行业标准规定的安全标准 (2 200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 但比欧洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 对海洋腹足类和双壳类动物规定的安全限量标准 (44 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[11] 高 8.1~13.6 倍。有研究发现, 野生河鲀个体越大, 其体内毒素的浓度越高^[12]。但本研究显示, 含 TTX 的半褶织纹螺的壳长、体质量均小于不含 TTX 的织纹

螺 ($p < 0.05$), 说明织纹螺的个体越大, 其体内 TTX 的累积不一定越多。

TTX 存在一系列结构相似的同系物, 如 4-epi-TTX、6-epi-TTX、11-deoxyTTX、4,9-anhydroTTX、5,6,11-trideoxyTTX、11-oxoTTX 等, 这些同系物可能与含 TTX 生物的合成代谢有关^[1,13]。Suo 等^[14] 在日本有毒扁虫 (*Planocera multitentaculata*) 中检测到 TTX 及 trideoxyTTX、monodeoxyTTX、dideoxyTTX 等主要同系物。Vlasenko 和 Magarlamov^[15] 在不同的纽形动物 (*Cephalothrix cf. simula*) 中检测到 7~11 种 TTX 同系物, 其中包含 2 种新的 trideoxy-TTX 同系物; 同时发现不同器官中的毒素成分相同, 但毒素浓度不同。罗璇等^[1] 对江苏省连云港市和浙江省舟山市采集的织纹螺进行检测, 发现 trideoxyTTX 是织纹螺的主要毒素成分, TTX 和其他

2种同系物次之。本研究结果与上述研究相似,在福建近岸海域的半褶织纹螺体内同时检测到TTX及3种同系物,其中trideoxyTTX的色谱峰面积最大,deoxyTTX、TTX次之。虽然trideoxy-TTX、deoxyTTX在织纹螺中所占比例较大,但两者均属于TTX脱氧同系物,其羟基数量较少,降低了与钠离子通道的结合能力,毒性低于TTX,因此织纹螺的毒性主要与其体内TTX的浓度相对应^[16-17]。

3.2 含和不含 TTX 半褶织纹螺的菌群结构和功能预测

相关研究表明,有毒河鲀独特的食物偏好可能形成独特的肠道微生物群,这可能为TTX的生物合成创造了必要条件^[6]。Lin等^[18]对包含织纹螺在内的3种螺类进行了跟踪监测,发现螺体内的TTX质量分数与菌群数量的变化有一定关系。本研究中含TTX织纹螺的群落丰富度显著高于不含TTX织纹螺,但群落多样性无显著性差异。推测含TTX织纹螺群落丰富度的提高与某些产TTX相关菌在有毒织纹螺体内的大量富集有关,群落多样性无差异是由于2组织纹螺采自同一海域,细菌群落组成较为相似。

由于织纹螺的菌群结构研究尚未见报道,因此主要参考河鲀、纽虫等含TTX生物群的菌群研究结果进行分析。雷阳等^[19]研究表明,变形菌门为野生和养殖双斑东方鲀(*Takifugu bimaculatus*)肠道菌群的优势菌门,与产TTX相关的希瓦氏菌属、发光杆菌属(*Photobacterium*)、假交替单胞菌属在野生双斑东方鲀肠道中占一定比例,而在养殖双斑东方鲀中未发现。另有研究表明,5—6月黄鳍东方鲀(*T. xanopterus*)肠道的毒性最高,春、夏季肠道菌群中的优势物种包含弧菌属、弓形杆菌属、嗜冷杆菌属等^[20]。Melnikova和Magarlamov^[8]分析纽虫的群落结构发现,含和不含TTX纽虫的优势菌门均为变形菌门;这与本研究结果相似,变形菌门为含和不含TTX半褶织纹螺的主要优势菌门;与产TTX相关的弧菌属、嗜冷杆菌属、假交替单胞菌属为含TTX半褶织纹螺的主要优势菌属,而假交替单胞菌属、希瓦氏菌属为不含TTX半褶织纹螺的主要优势菌属。这些优势菌属大部分属于 γ -变形菌纲,与Pratheepa等^[21]研究发现的葡萄牙沿海腹足类动物内脏团中 γ -变形菌纲的16S rRNA基因序列数量达75%的结果相似。此外,在含和不

含TTX半褶织纹螺中检测到19个差异菌属,其中17个差异菌属在含TTX织纹螺中的相对丰度较高,可进一步说明含TTX织纹螺的群落丰富度高于不含TTX织纹螺。

迄今为止,TTX在宿主体内的生物合成机制问题仍未得到解答。有学者提出TTX生物合成途径的假说,认为TTX中的胍基部分来源于精氨酸前体,而糖环部分由聚酮链、C5糖环或萜类衍生而来^[22]。Li等^[6]利用宏基因组测序对有毒和无毒河鲀的肠道菌群进行基因功能预测,发现有毒河鲀体内菌群中谷氨酸到精氨酸的代谢通路明显上调,推测精氨酸是河鲀体内共生菌群合成TTX的前体物质。本研究中含和不含TTX织纹螺的菌群KEGG功能组成相似,这与2组的菌群结构无显著性差异有关。此外,2组的主要代谢通路包含氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素代谢、萜类和聚酮类物质代谢。由于TTX生物合成途径假说并未得到证实,因此织纹螺体内TTX及其同系物的合成是否与氨基酸代谢、萜类和聚酮类物质代谢有关仍需进一步研究。

3.3 半褶织纹螺体内产 TTX 相关细菌分析

关于TTX微生物来源的假说,认为共生细菌定殖在宿主的特定器官中产生次级代谢产物,这些产物被宿主吸收,并加以利用。而宿主则为共生细菌提供适宜的生长和代谢条件,特别是宿主会提供细菌所必需的信号分子,以诱导共生细菌高效提供次级代谢产物^[23]。研究人员已从各种含TTX的生物体及环境中发现了150多株产TTX微生物^[24],主要有变形菌门(弧菌属、希瓦氏菌属、假交替单胞菌属等)及放线菌门(微球菌属、玫瑰杆菌属、链霉菌属等);其次为厚壁菌门(芽孢杆菌属和肠球菌属等)、拟杆菌门(纤维单胞菌属、黏着杆菌属)等^[25]。如Turner等^[26]将从纽虫中分离得到的溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)在低温条件下进行培养,发现培养液中含有TTX。张璇^[22]从横纹东方鲀(*T. transverseis*)的肠道分离出了可以产TTX或其同系物的嗜冷杆菌属。岳田芳^[27]在海藻希瓦氏菌(*Shewanella algae*)发酵产物中检测到了TTX。Melnikova等^[28]从*Hubrechtella juliae*中分离鉴定出产TTX的假交替单胞菌属。本研究在含和不含TTX半褶织纹螺体内均检测到弧菌属、嗜冷杆菌属、假交替单胞菌属、希瓦氏菌属这4种产TTX相关菌属。该结果与在不含TTX的纽形动物中发

现产 TTX 相关菌的研究结果^[27]一致, 说明产 TTX 相关菌可同时存在于含和不含 TTX 的生物体中。

虽然弧菌属是目前报道最多的产 TTX 细菌, 占产 TTX 细菌菌株的 30% 以上, 但至今未能成功分离出持续产 TTX 的弧菌^[7,23]。有研究发现, 弧菌和蓝藻可能在有毒河鲀的肠道环境中形成共生关系, 由此怀疑 TTX 的生物合成是由弧菌或潜在触发物组成的共生体产生^[6]。本研究发现, 蓝藻门在含 TTX 织纹螺中的相对丰度是不含 TTX 织纹螺的近 2 倍, 但无显著差异 ($p>0.05$)。考虑到蓝藻与石房蛤毒素 (Saxitoxin, STX) 的生物合成有关, 而 STX 与 TTX 有相似的胍基结构, 建议后续可以开展相关研究。另有学者发现, 弧菌属可产生分子量与 TTX 相近的无毒化合物, 因此建议在评估产 TTX 细菌时需要对其产生的无毒化合物进行分析^[29]。基于此, Reveillon 等^[30]从贝类养殖环境中分离获得 122 株菌株, 经 LC-MS/MS 法检测未发现 TTX 及其他 5 种同系物。笔者课题组尝试从含 TTX 的织纹螺中分离产 TTX 菌株, 经酶联法检测、16S rRNA 鉴定, 获得弧菌属、嗜冷杆菌属、希瓦氏菌属、假交替单胞菌属等产 TTX 菌, 其中 TTX 最高质量分数可达 $99 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (湿质量); 然而这些菌株经 LC-MS/MS 法再次测定后, 未发现含有 TTX。该现象可能是由于: 1) TTX 同系物种类繁多, 酶联法检测容易受到 TTX 同系物干扰从而出现假阳性结果; 2) 目前市面上缺少 TTX 同系物标准品, 使得 LC-MS/MS 法不能对菌株的 TTX 同系物进行全面分析。因此, 今后可以聚焦 TTX 同系物或前体物质方面的研究, 这对探寻生物体内 TTX 的细菌性来源以及 TTX 的生物合成路径均具有重要的参考价值。

4 结论

产 TTX 相关菌可同时存在于含和不含 TTX 的半褶织纹螺中, 弧菌属、嗜冷杆菌属等产 TTX 相关菌更容易在含 TTX 的织纹螺中富集。结合织纹螺体内的毒素成分分析, 推测产 TTX 相关菌在生物体内并非直接产 TTX, 更可能产生 TTX 类似物或前体物质, 这些物质在生物体内进一步转化为 TTX。上述结论一定程度上解释了实验室内未能成功分离持续产 TTX 的细菌这一问题。

致谢: 衷心感谢福建省莆田市海洋与渔业局、莆田市秀屿区海洋与渔业局工作人员在织纹螺样品采集中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 罗璇, 于仁成, 王晓杰, 等. 中国沿海部分地区半褶织纹螺的毒性及毒素组成分析[J]. 海洋与湖泊, 2016, 47(2): 327-335.
- [2] 陈页, 张小军, 曾军杰, 等. 河豚毒素在半褶织纹螺体内富集和消除的研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(22): 97-99, 138.
- [3] 孙博伦, 王旭峰, 李来好, 等. 多壁碳纳米管固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定织纹螺中河豚毒素[J]. 南方水产科学, 2018, 14(5): 103-108.
- [4] 刘伟成, 姜蒙蒙, 黄晓林, 等. 织纹螺的生物学特征及毒性分析研究进展[J]. 水产科学, 2012, 31(3): 181-186.
- [5] 王晓杰. 织纹螺 (*Nassarius* spp.) 体内河豚毒素来源的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008: 21.
- [6] LI Z C, TIAN J G, LAI Y K, et al. Puffer fish gut microbiota studies revealed unique bacterial co-occurrence patterns and new insights on tetrodotoxin producers[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(5): 278.
- [7] BIESSY L, PEARMAN J K, SMITH K F, et al. Seasonal and spatial variations in bacterial communities from tetrodotoxin-bearing and non-tetrodotoxin-bearing clams[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1860.
- [8] MELNIKOVA D I, MAGARLAMOV T Y. The microbial community of tetrodotoxin-bearing and non-tetrodotoxin-bearing ribbon worms (Nemertea) from the sea of Japan[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(3): 177.
- [9] 黄连琴. 超高效液相色谱-串联质谱法测定闽东地区织纹螺中河豚毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9260-9265.
- [10] 罗璇, 于仁成, 王晓杰, 等. 福建沿海部分地区织纹螺毒性消长及毒素成分分析[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 636-643.
- [11] ANTONELLI P, PERUZZO A, MANCIN M, et al. Tetrodotoxin in bivalve mollusks: an integrated study towards the comprehension of the influencing factors of a newly native phenomenon[J]. *Chemosphere*, 2023, 339(2023): 139682.
- [12] 姚敬元, 金薇, 宫长宝, 等. 我国近海河豚毒素的分布特征[J]. 海洋环境科学, 2021, 40(2): 161-166.
- [13] 杜晟. 产河鲀毒素细菌的分离鉴定及弧菌群体感应元件 LuxR 对细菌河鲀毒素产量的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023: 278.
- [14] SUO R, TANAKA M, ASANO M, et al. Distribution of tetrodotoxin and its analogs in the toxic flatworm *Planocera multidentaculata* from Honshu Island, Japan[J]. *Fish Sci*, 2024, 90(2): 319-326.
- [15] VLASENKO A E, MAGARLAMOV T Y. Tetrodotoxin and its analogues in *Cephalothrix* cf. *simula* (Nemertea: Palaeonemertea) from the sea of Japan (Peter the Great Gulf): intrabody distribution and secretions[J]. *Toxins*, 2020, 12: 745.
- [16] 张瀚元, 李卫东, 张海恩, 等. 河豚毒素及其在河鲀体内积累研

- 究进展[J]. 水产学杂志, 2023, 36(4): 117-125.
- [17] LUO X, YU R C, WANG X J, et al. Toxin composition and toxicity dynamics of marine gastropod *Nassarius* spp. collected from Lianyungang, China[J]. *Food Addit Contam*, 2012, 29(1): 117-127.
- [18] LIN C L, WU Y J, LIN W F, et al. Seasonal characteristics and tetrodotoxin-producing ability of bacteria in gastropod *Oliva hira-sei*[J]. *Hydrobiologia*, 2013, 741(1): 23-32.
- [19] 雷阳, 王松刚, 陈钰, 等. 基于 16S rRNA 基因分析双斑东方鲀肠道微生物多样性[J]. 水产科学, 2020, 39(4): 579-584.
- [20] 毛婕. 东海区黄鳍东方鲀毒性及肠道内食源性物种季节分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 34.
- [21] PRATHEEPA V, ALEX A, SILVA M, et al. Bacterial diversity and tetrodotoxin analysis in the viscera of the gastropods from Portuguese coast[J]. *Toxicon*, 2016, 119: 186-193.
- [22] 张璇. 利用共生微生物研究河豚毒素的生物合成途径[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2013: 13-16, 38.
- [23] DEMAINE A L. Induction of microbial secondary metabolism[J]. *Int Microbiol*, 1998, 1(4): 259.
- [24] MAGARLAMOV T Y, MELNIKOVA D I, CHERNYSHEV A V. Tetrodotoxin-producing bacteria: detection, distribution and migration of the toxin in aquatic systems[J]. *Toxins*, 2017, 9(5): 166.
- [25] 杨紫涵, 蔡水淋, 许旻, 等. 产河豚毒素微生物的研究进展[J]. 渔业研究, 2024, 46(4): 403-412.
- [26] TURNER A D, FENWICK D, POWELL A, et al. New invasive nemertean species (*Cephalothrix simula*) in England with high levels of tetrodotoxin and a microbiome linked to toxin metabolism[J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(11): 452.
- [27] 岳田芳. 海藻希瓦氏菌发酵产生河豚毒素的提取与检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008: 65.
- [28] MELNIKOVA D I, BELENEVAI A, TYUNIN A P, et al. The taxonomic composition, characteristics, and neurotoxic activities of ribbon worm-associated bacteria from the sea of Japan[J]. *Russ J Mar Biol*, 2017, 43: 383-391.
- [29] STRAND M, HEDSTRÖM M, SETH H, et al. The bacterial (*Vibrio alginolyticus*) production of tetrodotoxin in the ribbon worm *Lineus longissimus*: just a false positive?[J]. *Mar Drugs*, 2016, 14: 63.
- [30] REVEILLON D, SAVAR V, SCHAEFER E, et al. Tetrodotoxins in French bivalve mollusks-analytical methodology, environmental dynamics and screening of bacterial strain collections[J]. *Toxins*, 2021, 13: 740.