

河豚毒素的微生物起源

The microbial origin of tetrodotoxin

吴韶菊, 崔建洲, 官庆礼

(中国海洋大学 生命科学与技术学部水产学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: T Q283

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)10-0081-05

河豚毒素(TTX)是一种毒性很强的海洋生物活性物质,为典型的神经 Na^+ 通道阻断剂。最初从鲉科(Tetradontidae)鱼中发现,故被 Tahara 命名为 Tetrodotoxin(TTX)^[1]。TTX 的分子结构为氨基全氢唑啉化合物,分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_8$, 相对分子质量为 319, 该分子中含有原酸酯结构,几乎所有的碳原子均具不对称取代。它微溶于水 and 浓酸,极易溶于含醋酸的水溶液,不溶于有机溶剂,纯品为无嗅无色针状固体结晶,易被碱还原。TTX 非常稳定,在日光下曝晒 20 d 或在盐水中盐腌 30 d,其毒性仍不能被全部破坏,只有在高温加热 30 min 以上或在碱性条件下才能被分解^[2]。其具有胍基是 TTX 的活性部位,通过它 TTX 可特异地结合于神经细胞膜钠通道上,进而抑制 Na^+ 内流,阻断神经兴奋的传导^[3]。因此 TTX 在神经生理研究中作为一种特异的神经工具药物已投入临床使用,并在戒除毒瘾、抗心律失常、呼吸抑制、预防肾功能衰竭、心血管疾病、镇痛、局部麻醉等方面有广泛的应用前景^[4]。

随着新的检测方法的应用,研究者发现 TTX 不只存在于鲉科鱼类中,在各类海洋脊椎动物(鱼类^[5]、两栖类^[6])、无脊椎动物(涡虫类^[7]、纽形动物^[8]、腹足类^[9]和头足类^[10]、节肢动物^[11]、棘皮动物^[12])中都有分布。

因此,人们逐渐改变了 TTX 是鲉科鱼特有的观点,它的起源问题成了学者们研究的热点,作者对此作了综述。

1 起源假说

1.1 内因说

主张内因说的学者认为河豚等含有的刺胞、毒腺中的蛋白质毒素是内源性毒素的来源。推测河豚鱼体内有特定功能或微生物能将摄入的食物转化为毒素。Matsumura 用人工授精法从河豚鱼(*Fugu nipohobles*)卵母细胞发育的胚胎中发现河豚毒素的毒

性随胚胎发育不断增高,提出 TTX 是河豚鱼胚胎的产物^[13]。但始终没有更多证据证实这种说法,因此内因说没有得到广泛认可。

1.2 外因说

日本学者清水、松居是最早提出外因说的学者。他们用含 TTX 的饵料投喂养殖的无毒河豚及人工采苗饲养的河豚,结果发生毒化现象,推测毒素的起源可能是外因性的。

1.2.1 食物链假说

桥本野口从海螺、海星及花纹爱洁蟹(*Atergatis floridus*)检出高浓度的 TTX,为食物链起源假说提供了证据。Noguchi 证实白法螺(*Boshubora*)体内的毒素是进食了含 TTX 的海星积累的,这是食物链假说的又一例证^[14]。但这些动物含毒程度为何因地区个体的不同有很大差别呢?毒素起源于含毒饵料假说也有不少难以自圆之处。于是松居提出了 TTX 微生物起源假说,但当时并无实验证据。

1.2.2 微生物起源假说

日本安元健从藻食性青点鹦嘴鱼中检出的毒素经氢氧化钠衍生后生成 TTX 衍生物 2-氨基-6-羟甲基基唑啉(C_9 碱);对摄食石灰藻的铜铸熟若蟹的检测证实同样含 TTX;而不摄食石灰藻的多毛纲动物也检测到 TTX 衍生物,因此认为石灰藻并非原始产毒者,推测石灰藻上可能有共生细菌附着^[2]。Noguchi 等由石灰藻和毒蟹的内脏分离的假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌培养液中得到 2 个有毒成分,确

收稿日期: 2005-04-31; 修回日期: 2005-04-08

基金项目: 山东省教育厅资助项目(001164504)

作者简介: 吴韶菊(1977-),女,山东临沂人,研究生,主要从事河豚毒素的微生物合成方面的研究,电话: 13573903609, E-mail: shaokuwu@163.com; 官庆礼,通讯作者, E-mail: qingli@vip.sina.com

证分别与河豚毒素及脱水河豚毒素一致, 碱液分解也生成 C₉碱; 高压液相、红外光谱、质谱分析确证是 TTX; 分别注射小鼠腹腔, 显示了与河豚毒素和脱水河豚毒素相对应的致死率, 从而证实 TTX 是细菌的代谢产物^[15], 这是 TTX 起源于共生微生物的最早证据。

迄今已发现很多产 TTX 的微生物类群。因此主张微生物起源假说的学者越来越多。

2 产毒菌

2.1 产毒菌的种类

自 Matsui 等首次提供实验证据证实 TTX 是外源性起源以来, 已从海藻^[16]、花纹爱洁蟹(*Atergatis folioides*)^[17]、多棘刺海星(*Astropecten polyacanthus*)^[18]、圆尾鲎(*Carcinoscorpius rotundicauda*)^[19]、虫纹东方鲀(*Fugu vermicularis*)^[20]和星点东方鲀(*Takifugu niphobles*)^[21]、腹足动物(*Niotha clethrata*)^[22]、纽虫动物^[8]中陆续分离到产 TTX 的细菌, 淡水沉积物中也有此类菌^[23]、海洋沉积物中分离的链霉菌(*Streptomyces* sp.) 能产 TTX 及其衍生物^[11]、海胆(*Meoma ventricosa*) 中分离的致病菌 VL-1^[24] 也被证实有产毒能力。

产 TTX 的微生物类群有弧菌属(*Vibrio*) 的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[22] 和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)^[25]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[26]、希瓦氏菌属的腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)^[21]、交替单胞菌(*Alteromonas*)^[16]、芽孢杆菌(*Bacillus*)^[23]、放线菌属的链霉菌(*Streptomyces*)^[11]。其中产毒力较高的主要是溶藻弧菌和河豚毒素互生单胞菌(*Alteromonas tetrodonis*)^[27]。

2.2 菌种性质

2.2.1 溶藻弧菌^[28]

革兰氏阴性菌, 弯曲杆状(0.5~3.0 μm), 单生鞭毛, 无芽孢, 无荚膜, 单个细胞有运动能力。形成圆形、黄色菌落, 直径为 3~4 mm。液化明胶, 水解淀粉, 氧化酶阳性, 脲酶阴性, 由葡萄糖产酸不产气, 可在 10~32℃ 生长, 耐盐。对弧菌抑制剂 O/129(2, 4-二氨基-6, 7-二异丙基噻唑) 敏感, H₂S 反应阴性, 吡啶反应阳性。

2.2.2 河豚毒素互生单胞菌^[27]

革兰氏阴性菌, 短杆状(1.0~2.4 μm), 兼性菌, 通过单极鞭毛运动, 无芽孢, 4~35℃ 生长, 耐盐, 由葡萄糖产酸不产气, 产明胶酶, 脂肪酶, 核酸酶, 但不产淀粉酶, 壳多糖酶, 褐藻酸酶。

2.2.3 假单胞菌^[26]

革兰氏阴性菌, 端生鞭毛, 不能发酵蔗糖, 产生棕

黄色色素, 有胞外 Dnase, 需氧。

2.2.4 腐败希瓦氏菌^[21]

革兰氏阴性菌, 杆状(1.0~3.0 μm), 单鞭毛, 生长需 Na⁺; 氧化酶、脲酶反应阳性; 能产生硫化氢; 能转化硝酸盐为亚硝酸盐; 产 Dnase; 能水解明胶和聚山梨酸酯 80。

3 细菌的培养方法

3.1 培养基的类型

3.1.1 海洋弧菌属(溶藻弧菌)

3.1.1.1 牛肉汤培养基^[29]

0.5% 葡萄糖, 0.5% 蛋白胨, 0.5% 牛肉膏浸提物, 3% NaCl, pH 8.0。

3.1.1.2 PCA 培养基^[29]

0.5% 胰蛋白胨, 0.25% 酵母膏, 0.1% 葡萄糖, 1.5% 琼脂, 3% NaCl, pH 7.0。

3.1.1.3 TCBS 培养基^[29]

0.5% 酵母膏, 0.5% 酪蛋白胨, 0.5% 肉胨, 1.0% 柠檬酸钠, 0.1% 柠檬酸铁 0.004% 百里酚, 0.004% 溴百里酚蓝, 1.4% 琼脂, pH 8.6。

3.1.2 假单胞菌属^[26]

15 g 蛋白胨, 2.5 g 酵母膏, 0.1 g FePO₄, 1 000 mL 含 6.0 g Tris-HCl 过滤海水, pH 7.0。

3.1.3 希瓦氏菌属^[30]

0.5% 蛋白胨, 0.1% 酵母膏, 1% NaCl, 0.2% KCl, 0.4% MgSO₄ · 7H₂O。

3.1.4 链霉菌属^[11]

6 g/L 蛋白多胨, 10 g/L 可溶性淀粉, 1 g/L 酵母膏, 蒸馏水: 陈海水(1: 3), pH 7.0。

3.1.5 芽孢杆菌属^[23]

0.5 g 蛋白胨, 0.1 g 酵母膏, 0.01 g 柠檬酸铁, 0.2 g K₂HPO₄, 15 g 琼脂, pH 5~7.6。

3.2 培养条件

海洋弧菌属: 20℃, 5 d^[20]; 23℃, 1~3 d^[29]; 假单胞菌属: 28℃, 6 d 后置 5℃, 4 d^[26]。希瓦氏菌属: 20℃, 18 h^[30]; 链霉菌属: 27℃, 5~7 d^[11]。

4 细菌毒素的纯化处理方法

4.1 弧菌属(溶藻弧菌)

离心培养液, 在细胞沉积物中加乙酸溶液, 超声破碎, 加热, 超滤, 冷冻干燥滤液。用 0.03 mol/L 乙酸溶解冻干物后过生物胶柱(2.5 cm × 94 cm), 收集组分备测^[20]。

4.2 假单胞菌属^[26]

菌液离心后, 挥干上清, 用含 1% 乙酸的甲醇溶



液提取 3 次后挥干溶剂,依次过活性炭柱, P-2, Bio-Rex70 柱后收集组分别测。

4.3 希瓦氏菌属(腐败希瓦氏菌)^[21]

乙酸调节菌液 pH,离心后以无离子水稀释上清,过活性炭柱,水洗,再用含 1% 乙酸的 20% EtOH 洗脱,挥干洗脱液,用水定容做毒性检测。

对于细菌沉积物则悬浮于 0.1% 乙酸中,沸水浴加热,离心后以上述方法处理,合并上清,浓缩后做毒性检测。

4.4 放线菌属(链霉菌)^[1]

离心,水洗,溶于乙酸制成菌悬液,超声破碎后加热,过滤,低于 40℃ 低压蒸干滤液,用无离子水溶解后过 Sep-Pak C₁₈ 柱,冷冻干燥洗脱液,水溶后备测。

5 微生物产生的 TTX 测定及检测方法

5.1 组织培养分析法

乌本苷(ouabain):又称 G-毒毛旋花苷,能抑制心肌细胞 Na⁺-K⁺ 泵的活性,从而降低钠钙交换器效率,使钙离子内流增多,加强心肌收缩因而具强心作用。藜芦碱(jervine)存在天百合植物(*Schenocaulon officinale*)等根部,为多种生物碱混合物^[31]。

有乌本苷存在时,藜芦碱类可使小鼠成神经细胞瘤(Neuroblastoma)细胞系钠流入量增加,导致细胞肿胀和程序性死亡。而 TTX 及贝毒可堵塞钠通道,此拮抗作用可使细胞继续生长,通过计数细胞存活数可衡量 TTX 含量^[1]。

Ron 等在此原理基础上用从红罗非鱼(*Sarotherodon mossambicus*)中得到的红细胞系(RBCs)代替小鼠成神经细胞瘤细胞,检测到有乌本苷和藜芦碱存在时使用钠离子通道阻断剂可以抑制红细胞溶血的浓度分别为 0.3 μg/mL STX, 3.5 μg/mL neo-STX, 3.0 μg/mL GTX 和 5.0 μg/mL TTX。

5.2 小鼠生物定性试验法

小鼠法是 20 世纪 40 年代美国学者建立的,目前通用的鼠单位定义是在 30 min 内杀死一只 20 g 左右的雄性 ddY 品系小鼠的毒素量(1 MU = 0.22 μg TTX)^[32]。

在 TTX 微生物起源研究中,研究者多先用小鼠法对微生物产物定性^[22],后借助其他方法作进一步检测和定量工作。

5.3 高效液相色谱法

高效液相色谱(HPLC)用于定量检测 TTX 多采用反相色谱。目前大多研究者使用荧光检测器检测微生物产生的 TTX^[21, 22]。原理是 TTX 加碱衍生后

生成 C₉ 碱,该物质发荧光。Yasumoto 等使用 10 m × 0.5 mm 旋管,沸水浴加热使 TTX 与 4 mol/L NaOH 反应得最低检出限为 0.44 μg/L。Yotsu 等将不锈钢管浸入硅油池中,135℃ 恒温,分离到 6-epi-TTX,检出限 9.6 × 10⁻³ ~ 9.45 μg/L。

Onoue 等提出邻苯二醛法,最低检出限为 3.2 × 10⁻⁴ ~ 6.4 × 10⁻⁴ μg/L。原理是利用 Roth 提出的邻苯二醛在还原性巯基乙醇存在下与伯胺反应产生荧光,因此瓜氨酸、精氨酸、赖氨酸、乙醇胺等对测定有干扰。

HPLC 融分离与定量于一体,快速、灵敏,不失为一种好的测定方法;但所需仪器昂贵,同时对样品的纯度要求较高,推广受到限制。

5.4 紫外分光光度法

陈玉仁等^[33]建立的用紫外分光光度计测定 TTX 质量浓度的方法。原理是河豚毒素水解为 C₉ 碱时,也定量生成草酸钠,后者在紫外区有明显吸收,从而间接定量。TTX 质量浓度在 20~100 μg/L 范围内与光密度值呈线性关系。此法与荧光法相比,两者检出限相近(0.3 μg/L),且仪器设备较便宜。

5.5 气相色谱(GC)质谱(MS)联机

原理是先将 TTX 通过碱反应衍生为 C₉ 碱,用正丁醇反复萃取后,再用 N,O-二乙酰胺-三甲基硅烷-吡啶(2/1/1)进行三甲基硅烷(TMS)化后测定。因灵敏度高也是很多研究河豚毒素产生菌产生 TTX 的常用方法^[21, 22]。

5.6 免疫化学测定方法

TTX 免疫检测法的基础是单克隆抗体(McAb)技术,将小分子 TTX 连接到大分子载体上使其成为完全抗原再用于免疫动物。最早是 1989 年 Watabe 等以 BSA 为载体的方法,但存在着 McAb 反应性低的缺陷。Raybould 用碱性磷酸酶标记 McAb 间接法灵敏度为 0.03 μg/L。

综上,组织培养分析法因其灵敏度高费用低尤其适于检测由微生物产生的产量极低的 TTX,但它需 Neuroblastoma,培养操作复杂;小鼠法相对直观,但检测微生物产的 TTX 灵敏度过低,且小鼠个体差异大,误差大;荧光 HPLC 法灵敏,检测限低,缺点在于处理物必须经碱衍生,且对样品纯度要求高,所需仪器昂贵,较难推广。其他检测微生物代谢产生的 TTX 方法也各有优缺点,因此在实际工作中应根据需要选择最合适的检测手段。

6 应用前景、存在问题及展望

河豚毒素是一种强毒性的生物碱类毒素,它在神



经生理研究中作为神经工具药物已投入临床使用,河豚毒素纯品的国际市场价每克可达 21 万美元,利润空间很大。近代人们对 TTX 的纯化做了大量工作,我国于 1958 年由上海水产学院首先进行了 TTX 的提取分离工作,但目前我国 TTX 的提取纯度尚难达到试剂级的高精水平。现今常用的从河豚鱼体不同部位提取纯化 TTX 的方法,始终难以解决原料来源单一、处理过程复杂、纯品得率低等弊病,使 TTX 大量投入临床使用受到限制。

近年来关于河豚毒素微生物起源的研究成果屡见报道,为人们利用河豚毒素另辟蹊径。如果细菌发酵生产 TTX 成为可能,就可解决大量捕杀河豚鱼受到资源、时空的限制且产量低等难题;并且避免破坏河豚鱼资源及至破坏生态平衡等问题。国外早在上世纪 80 年代就已着手此研究,并取得骄人的成绩,有的微生物类群甚至已被用于专门生产 TTX;我国在这方面研究相对较少。如果能尽快解决 TTX 的微生物发酵难题,无疑对于开辟 TTX 的生产市场进而广泛应用于临床都将是很大的贡献。

但目前也存在诸如微生物产河豚毒素产量非常低,仅为 ng 级,且其生产机制尚不清楚,使得大规模工业生产尚无定期;并且可能存在细菌发酵产生的 TTX 与经过食物链逐级代谢富集最后在河豚鱼等动物体内累积的 TTX 存在差异等问题;随着 TTX 产生菌的发现及使用也出现一些争论:Matsumura 发现 TTX 的检测方法出现假阳性的结果^[34],并提出细菌没有产生 TTX 能力的论断^[35];原作者 Kim 做出回应说并非所有弧菌都具产毒力,可能是 Matsumura 从河豚鱼肠中得到的菌株恰巧无产毒力而导致相悖的结果^[36]。这都有待进一步研究。TTX 在整个海洋生态环境中的广泛分布足以说明其产生、转化、转移及积累是很复杂的过程^[37],笔者推测可能是微生物能够产生和 TTX 相类似的物质,经过食物链逐级积累、转化后在高级消费者中成为有稳定化学结构和功能的 TTX。至于 TTX 在食物链中逐级积累的现象,可能是与其作为生物的防御武器^[38]有关。今后需进一步落实的工作是切实开展实验证实微生物是否确实能产 TTX;进一步阐明 TTX 微生物合成的机制;如何诱导具有产 TTX 能力的菌株提高产量,从而实现工业化大生产,使得 TTX 的临床广泛使用成为可能。

参考文献:

[1] Do H K, Kogure K, Imada C, *et al.* Tetrodotoxin production of actinomycetes isolated from

marine sediment [J]. *Appl Bacteriol*, 1991, 70: 464–468.

- [2] 邓尚贵,彭志英,杨萍,等.河豚毒素研究进展[J].海洋科学,2002,26(10):32–35.
- [3] 陈翼胜,丁晓琴.钠离子通道海生毒素构效关系[J].中国海洋药物,1989,2:7–10.
- [4] 朱成华,王桂兰,李蕴山,等.河豚毒素(TTX)对抗心律失常常药疗效和毒性的影响[J].海洋药物,1984,3:7.
- [5] Nunez V E J, Yotsu Y M, Sierra B A P, *et al.* Toxicities and distribution of tetrodotoxin in the tissues of puffer fish found in the coast of the Baja California Peninsula, Mexico [J]. *Toxicon*, 2000, 38: 729–734.
- [6] Mebs D, Schmidt K. Occurrence of tetrodotoxin in the frog *Atelopus oxyrhynchus* [J]. *Toxicon*, 1989, 37: 819–822.
- [7] Miyazawa K, Jeon J K, Maruyama J, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin in the flatworm *Planocera multitentaculata* [J]. *Toxicon*, 1986, 24: 645–650.
- [8] Stuart C, McEvoy E G, Gibson R. The Production of tetrodotoxin-like substances by nemertean worms in conjunction with bacteria [J]. *J Experim Marine Biol Ecol*, 2003, 288: 51–63.
- [9] Hwang D F, Lin L C, Jeng S S. Occurrence of a new toxin and tetrodotoxin in two species of the Gastropod Mollusk Nassariidae [J]. *Toxicon*, 1992, 30(1): 41–46.
- [10] 李青译.河豚毒素存在于平涡虫(*Planocera multitentaculata*)之中[J].中国海洋药物,1989,2:52.
- [11] Tsai Y H, Hwang D W, Chai T J, *et al.* Toxicity and toxic components of two xanthid crabs, *Atergatis floridus* and *Demania reynaudi*, in Taiwan [J]. *Toxicon*, 1997, 8: 1327–1335.
- [12] Maruyama J, Noguchi T, Jeon J K, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin in the starfish, *Astropecten latespinosus* [J]. *Experientia* 1984, 40: 1395–1396.
- [13] Matsumura K. Production of tetrodotoxin in puffer fish embryos [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 1998, 6: 217–219.
- [14] Noguchi T, Narita H, Maruyama J, *et al.* Tetrodotoxin in the starfish *Astropecten polyacanthus*, in association with toxification of a trumpet shell, “Boshubora” *Charonia sauli* [J]. *Bull Jpn Soc Sci Fish*, 1982, 8: 1173–1177.
- [15] 陈永豪译.河豚毒素起源的新学说——通过高精度及高灵敏度分析,初步证实毒素的微生物起源学说[J].海洋药物,1987,2:53–54.
- [16] Yasumoto T, Yasumura D, Yotsu M, *et al.* Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin [J]. *Agri Boil Chem*, 1986, 50: 793.



- [17] Noguchi T, Jeon J K, Arakawa O, *et al.* Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from the intestines of a Xanthid Crab, *Atergatis floridus* [J]. **J Biochem**, 1986, 99: 311– 314.
- [18] Narita H, Matsubara S, Miwa N, *et al.* *Vibrio alginolyticus*, a TTX– producing bacterium isolated from the Starfish *Astropecten polyacanthus* [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1987, 4: 617– 621.
- [19] Kungsuwan A, Noguchi T, Arakawa O, *et al.* Tetrodotoxin-producing bacteria from the Horseshoe Crab *Carcinoscorpius rotundicauda* [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1988, 10: 1 799– 1 802.
- [20] Noguchi T, Hwang D F, Arakawa O, *et al.* *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis vermicularis* [J]. **Marine Biology**, 1987, 94: 625– 630.
- [21] Matsui T, Taketsugu S, Kodama K, *et al.* Production of tetrodotoxin by the intestinal bacteria of a puffer fish *Takifugu niphobles* [J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1989, 12: 2 199– 2 203.
- [22] Cheng C A, Hwang D F, Tsai Y H, *et al.* Microflora and Tetrodotoxin– producing bacteria in a Gastropod, *Niotha clathrata* [J]. **Fd Chem Toxic**, 1995, 33: 929– 934.
- [23] Do H K, Hamasaki K, Ohwada K, *et al.* Presence of tetrodotoxin and tetrodotoxin producing bacteria in freshwater sediments [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 99: 3 934– 3 937.
- [24] Ritchie K B, Nagelkerken I, James S, *et al.* A tetrodotoxin producing marine pathogen [J]. **Nature**, 2000, 23: 354.
- [25] Gallacher S, Birkbeck T H. Effect of phosphate concentration on production of tetrodotoxin by *Alteromonas tetradonis* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1993, 11: 3 981– 3 983.
- [26] Yotsu M, Yamazaki T, Meguro Y, *et al.* Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a pufferfish [J]. **Toxicon**, 1987, 2: 225– 228.
- [27] Simidu U, Tsukamoto K K, Yasumoto T, *et al.* Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin [J]. **Intern J System Bacteriol**, 1990, 4: 331– 336.
- [28] Simidu U, Noguchi T, Hwang D F, *et al.* Marine bacteria which produce tetrodotoxin [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1987, 53: 1 714.
- [29] Lee Myoung-Ja, Jeong D Y, Kim W S, *et al.* A Tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2000, 4: 1 698– 1 701.
- [30] Nozue H, Hayashi T, Hashimoto Y, *et al.* Isolation and characterization of *Shewanella alga* from human clinical specimens and emendation of the description of *S. alga* Simidu *et al.*, 1990, 335 [J]. **Intern J System Bacteriol**, 1992, 4: 628– 634.
- [31] 于瑞莲, 王琴. 河豚毒素的生物合成[J]. 中国海洋药物, 2002, 4: 40– 42.
- [32] 李晓川, 林美娇. 河豚鱼及其加工利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 3.
- [33] 陈玉仁, 程军. 用紫外分光光度法测定河豚毒素[J]. 中国海洋药物, 1984, 2: 9– 11.
- [34] Matsumura K. Reexamination of tetrodotoxin production by bacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1995, 61: 3 468– 3 470.
- [35] Matsumura K. No ability to produce tetrodotoxin in bacteria [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67: 2 393– 2 394.
- [36] Kim D S, Kim C H. Author's Reply for “No ability to produce tetrodotoxin in bacteria” [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67: 2 393– 2 394.
- [37] 李秋芬, 徐怀恕. 河豚毒素(TTX) 及其微生物起源[J]. 海洋通报, 1994, 4: 86– 90.
- [38] Saito T, Noguchi T, Harada T, *et al.* Tetrodotoxin as a biological defense agent for puffers [J]. **Bull Jpn Soc Sci fish**, 1984, 7: 1 175– 1 180.

(本文编辑: 刘珊珊)