

文章编号:1005-8737(2001)03-0040-05

嗜水气单胞菌 BSK-10 株的优化培养条件研究

钱冬,曹铮,沈锦玉,沈智华,尹文林,吴颖蕾,张念慈

(中国水产科学研究院 鱼病研究室,浙江 湖州 313001)

摘要:用正交试验研究了嗜水气单胞菌 BSK-10 株的优化培养条件。结果表明:葡萄糖、甘油对 BSK-10 株有显著的促生长作用;各种无机离子中, HPO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对 BSK-10 生长有显著促进作用,而 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 则表现为抑制作用; Na_2HPO_4 与各种离子间存在交互作用, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 的促生长作用在 Na_2HPO_4 的存在时表现得极为明显,而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Mn^{2+} 在 Na_2HPO_4 存在时有轻微抑制作用;葡萄糖对不同来源的鱼类嗜水气单胞菌致病株有不同的效应。BSK-10 的生长动态研究表明,不同温度下 BSK-10 株达到对数生长及最大菌量的时间不同,以 30℃ 为最佳。

关键词:嗜水气单胞菌;BSK-10 株;优化培养;生长
中图分类号:S917.1 **文献标识码:**A

由致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)引起的淡水鱼细菌性败血症(俗称暴发性鱼病)是 80 年代后期在我国出现大规模流行的传染病,危害鲢、鲫、鳊、鳙等多种养殖鱼类,造成养殖鱼类大批死亡^[1,2]。该病广泛分布于我国黄河以南广大主要养鱼地区。据初步统计,在 80 年代末至 90 年代初,全国每年因该病而造成的鱼产量损失达 30~40 万吨,价值 15~20 亿元,为建国以来所罕见。近年来,该病在各地危害有所减轻,但仍是鲢、鲫、鳊、鳙等常规养殖品种的主要病害。“八五”期间,国内学者研制了用于预防该病的嗜水气单胞菌灭活菌苗,并在主要疫区推广应用,取得了较好的效果^[3~5]。但嗜水气单胞菌菌苗制备还停留在实验室阶段,菌苗制备效率较低。为了提高单位体积的嗜水气单胞菌培养效率,为菌苗的大规模制备提供理论依据,本文进行了嗜水气单胞菌优化培养条件的研究。旨在开展菌苗工厂化生产工艺技术研究,确定菌苗工厂化生产的各种最佳技术参数。

收稿日期:2000-11-20

基金项目:“九五”国家攻关项目(96-005-03-02)

作者简介:钱冬(1963-),男,浙江人,副研究员,从事水产病害研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

嗜水气单胞菌菌株 BSK-10、TPS-30、J-1 和安 96-1 于 1990~1996 年分离自患暴发病鱼,其中,TPS-30 属 0:9 血清型,其余属 0:5 血清型。实验摇床购自武汉科学仪器厂,测定蛋白酶用偶酪蛋白(Azocasein)为 Sigma 产品,其余试剂均为分析纯或生物试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基成份的设计 基本培养基为营养肉汤,配方为:蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、NaCl 5 g,加水至 1 L,调 pH 为 7.0~7.2。采用正交设计法^[6],分析各因子对生长的影响,以极差(R)表示各因子对测定指标的作用,极差计算公式为: $R = \text{高水平菌量之和} - \text{低水平菌量之和}$ 。

1.2.2 主要生长指标的测定 细菌浓度用分光光度计测定 OD₅₆₀,先测定已知菌浓度 OD 值,建立标准曲线。按下式计算细菌浓度:

$$X = (18.76Y - 0.73) \times D$$

式中: X - 细菌浓度; Y - OD₅₆₀; D - 稀释倍数。

测定菌浓度时, 稀释待测液使 OD₅₆₀ 在 0.10~0.70 之间, 以减少测定误差。

另取细菌培养物, 4℃ 9 000 r/min 离心后取上清, 用人 O 型血测溶血效价^[7], Azocasein 法测蛋白酶活力, 以 OD₄₄₀ 表示上清的蛋白酶活力^[8]。

2 结果

2.1 培养基基础成份对嗜水气单胞菌生长的影响

用嗜水气单胞菌 BSK-10 株摇床培养, 对蛋白胨、葡萄糖、牛肉膏、NaCl 4 个因子×3 个水平的正交试验结果见表 1。由表 1 可见, 蛋白胨、牛肉膏及 NaCl 对 BSK-10 株的菌浓度无明显影响, 而葡萄糖水平则对 BSK-10 的生长有显著的影响, 极差 (R) 为 155.4。

表 1 培养基基础成份对嗜水气单胞菌 BSK-10 生长的影响

编号 No.	蛋白胨/% Peptone	葡萄糖/% Glucose	牛肉膏/% Beef extracts	NaCl/% (×10 ⁸ CFU·ml ⁻¹) Bacteria	菌量/ Bacteria
1	2	2	1	1	82.53
2	2	1	0.5	0.5	76.62
3	2	0	0.1	0	33.66
4	1	2	0.5	0	90.69
5	1	1	0.1	1	76.81
6	1	0	1	0.5	36.10
7	0.5	2	0.1	0.5	85.81
8	0.5	1	1	0	84.97
9	0.5	0	0.5	1	36.85
高 High	195.8	262.0	206.6	199.2	
中 Medium	198.0	197.7	204.2	198.5	
低 Low	207.6	106.6	196.3	209.3	
R	-11.8	155.4	10.3	-10.8	

2.2 葡萄糖对嗜水气单胞菌不同菌株的生长影响

以营养肉汤为基础培养基, 摇瓶振荡培养, 表 2 为培养 24 h 后的菌量、蛋白酶活力及溶血效价。由表 2 可见, 葡萄糖对不同的嗜水气单胞菌有不同的影响; 对 BSK-10、J-1、安 96-1 株, 葡萄糖可显著提高细菌产量, 同时上清的溶血素产量也提高, 但对蛋白酶分泌的影响不明显; 对于 TPS-30 株, 葡萄糖的作用不明显, 甚至对于蛋白酶的分泌有抑制作用。考虑到菌株的毒力、保存稳定性、血清型等因素, 选用 BSK-10 作为气单胞菌菌苗制备的生产菌株。

2.3 主要添加成份对 BSK-10 生长的影响

以营养肉汤为基础培养基, 摇瓶振荡培养, 研究葡萄糖、甘油、硫酸铵对 BSK-10 菌量、蛋白酶、溶

血素分泌的影响, 结果见表 3。由表 3 可见, 葡萄糖、甘油可显著增加菌量, 硫酸铵对菌量影响不明显。从本次实验看, 各因子对于蛋白酶、溶血素的分泌影响不大。以添加各因子后菌量的最大值计算出极差 (R), 结果显示, 葡萄糖、甘油添加量分别以 0.5%、1% 为最好 (在以下实验中, 也以此添加量作为实验的基础改良配方)。

表 2 葡萄糖对嗜水气单胞菌不同菌株的生长影响

Table 2 Effects of glucose on different strains of *A. hydrophila*

菌株 No. of strain	葡萄糖添加 Glucose supplemented	菌量/(×10 ⁸ CFU·ml ⁻¹) Bacteria	蛋白酶活力 Protease act	溶血效价 Hemolytic titer
BSK-10	+	128.23	0.175	1:16
BSK-10	-	87.89	0.208	1:16
J-1	+	115.34	0.168	1:32
J-1	-	79.18	0.218	1:16
安 96-1	+	127.87	0.165	1:32
安 96-1	-	94.81	0.198	1:16
TPS-30	+	100.30	0.022	1:16
TPS-30	-	94.81	0.193	1:32

2.4 无机离子对 BSK-10 生长的影响

以营养肉汤为基础培养基, 摇瓶振荡培养, 无机离子对 BSK-10 生长的影响结果见表 4。由表 4 可见, 对 BSK-10 生长有显著促进的无机离子为 HPO₄²⁻、Fe²⁺、Ca²⁺、(NH₄)₂SO₄、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 有一定的促进作用, 而 Cu²⁺、Co²⁺ 则表现为抑制作用。培养液中 Na₂HPO₄ 影响无机离子对 BSK-10 的作用, Na₂HPO₄ 与其他离子间存在交互作用, Fe²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺ 在 Na₂HPO₄ 存在时表现为明显的促生长作用, 而无 Na₂HPO₄ 时促生长作用不明显; (NH₄)₂SO₄、Mn²⁺ 在 Na₂HPO₄ 存在时有轻微抑制作用, 而不加 Na₂HPO₄ 则表现促生长作用; Ca²⁺、Cu²⁺、Co²⁺ 的作用不受 Na₂HPO₄ 影响。

2.5 BSK-10 生长动态

以不同的改良营养肉汤为培养基, 摇瓶振荡培养, 在不同温度及不同培养基下 BSK-10 的生长曲线见图 1。A、B 分别为普通营养肉汤和改良营养肉汤在不同温度下的 BSK-10 生长曲线, 由图 1 可见, BSK-10 在不同温度下达到最大菌量的时间有一定差别, 以改良营养肉汤 30℃ 培养最好, 达到最大菌量的时间为 36~40 h, 维持对数生长的时间也最长; 采用普通营养肉汤培养菌量均较低, 25℃ 时对数生长期维持较长, 35℃ 达到对数生长期的时间最

短,但很快开始衰退。C为普通营养肉汤、改良营养肉汤及改良营养肉汤+0.1 mol/L Na_2HPO_4 3种培养基在30℃培养下BSK-10的生长比较,结果表明,改良培养基可极大提高BSK-10的菌量,并延

长对数生长期,以改良肉汤+0.1 mol/L Na_2HPO_4 组为最好,最高菌量可达 380×10^8 CFU/ml。此外,改良培养基溶血素和蛋白酶的产量也比普通肉汤组有较大的提高(数据略)。

表3 BSK-10在不同添加成份的生长与胞外产物生产情况

Table 3 Growth and extracellular production of BSK-10 with different supplemented components

编号 No.	葡萄糖 Glucose	甘油/% Glycerine	硫酸铵/% (NH_4) ₂ SO ₄	菌量/($\times 10^8$ CFU·ml ⁻¹) Bacteria	蛋白酶 OD ₄₄₀ Protease	溶血效价 Hemolytic titer
1	1	1	0.1	187.93	0.63	1:8
2	1	0.05	0.05	165.41	0.60	1:8
3	1	0	0	165.41	0.66	1:16
4	0.5	1	0.05	247.95	0.61	1:16
5	0.5	0.05	0	184.17	0.68	1:16
6	0.5	0	0.1	129.40	0.70	1:16
7	0	1	0	129.77	0.66	1:16
8	0	0.05	0.1	131.65	0.62	1:16
9	0	0	0.05	82.88	0.67	1:16
高 High	518.8	565.7	449.0			
中 Medium	561.5	481.2	496.2			
低 Low	344.3	377.7	479.4			
R*	216.7	188	16.8			

* 各组间仅菌量有明显差异。The amount of bacteria shows significant difference between different groups.

表4 无机离子对BSK-10生长的影响

Table 4 Effects of inorganic ions on the growth of BSK-10

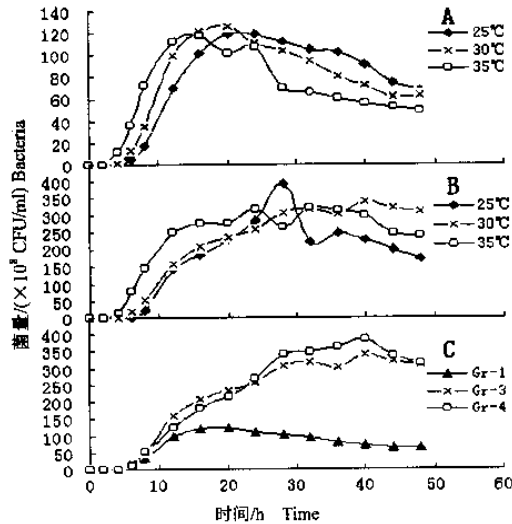
无机盐 Inorganic salt	添加量 Dose added	添加 Na_2HPO_4 (I) Na_2HPO_4 supplemented		不加 Na_2HPO_4 (II) No Na_2HPO_4 supplemented		I + II	
		+	-	+	-	+	-
Na_2HPO_4	0.01 mol/L	-	-	-	-	1 722.5	1 080.6
(NH_4) ₂ SO ₄	0.05%	511.97	568.63	987.32	735.19	1 499.3	1 303.8
MgSO ₄	0.1 g/L	610.65	469.95	860.51	862.00	1 471.2	1 332.0
CaCl ₂	0.02 g/L	564.65	516.10	941.90	780.97	1 506.0	1 297.1
FeSO ₄	0.039 7 g/L	793.50	286.87	908.90	813.61	1 702.6	1 100.5
ZnSO ₄	3.62 mg/L	566.00	514.60	914.15	808.36	1 480.2	1 322.9
CoCl ₂	0.15 mg/L	517.23	563.37	800.85	921.66	1 318.1	1 485.0
CuSO ₄	0.15 mg/L	498.84	581.76	881.14	841.37	1 380.0	1 423.1
MnSO ₄	1.5 mg/L	514.60	566.00	914.15	808.36	1 428.8	1 374.4

* +—添加无机盐 With inorganic salts added. —不加无机盐 No inorganic salt added.

3 讨论

用疫苗预防鱼类流行病是当前水产病害防治的发展趋势,对于由嗜水气单胞菌引起的鱼类传染病,国内学者已研制了嗜水气单胞菌灭活疫苗及免疫技术^[3,4],并在主要疫区推广应用,取得了较好的效果。但实验室嗜水气单胞菌疫苗制备效率较低,表现为菌量及溶血素、蛋白酶等主要保护性抗原效价较低,生产实践中只能采用较高的菌苗使用浓度进行免疫,加上目前鱼类免疫,大多采用浸泡免疫,疫苗利用率不高,使得免疫成本相对较高,客观上影响

了疫苗的推广应用。因此,建立高效的嗜水气单胞菌培养技术,是今后开展大规模生产的需要,也是降低鱼类免疫成本必需的。本文研究了嗜水气单胞菌优化培养条件,结果表明,采用改良的培养基在30℃培养,可使单位培养体积内的细菌产量大大提高,最高可达 380×10^8 CFU/ml,是普通培养基的3倍以上,并且其溶血素和蛋白酶产量均有较大程度的提高。



A: 普通营养肉汤 Nutrient broth; B: 改良营养肉汤 Modified nutrient broth; C: 不同培养基下的生长曲线(30°C) Growth curve in different broth at 30°C; Cr-1: 普通营养肉汤; Cr-3: 改良营养肉汤(葡萄糖 0.5%, 甘油 1%); Cr-4: Cr-3+0.1 mol/L Na_2HPO_4

图 1 不同温度及不同培养基下 BSK-10 的生长曲线

Fig. 1 The growth curves of BSK-10 at different temperatures in different broths

在影响嗜水气单胞菌生长及毒素分泌的各种因素中,葡萄糖是最值得注意的。本研究发现,对于不同的嗜水气单胞菌菌株,葡萄糖表现出不同的效应。特别是对于 TPS-30,葡萄糖的添加对于溶血素、蛋白酶的分泌反而有抑制作用。值得注意的因素是通气量,在实验中发现,通气量的充足与否则有时直接影响菌株对葡萄糖的效应,如 BSK-10,在通气不充分时,添加葡萄糖反而使溶血素的分泌受到极大抑制(数据未列)。由于技术上的原因,在实验室无法定量的控制通气。这方面的工作有待于设备和方法改进后进一步研究。

The optimum conditions for growth of *Aeromonas hydrophila* BSK-10

QIAN Dong, CAO Zheng, SHEN Jin-yu, SHEN Zhi-hua, YIN Wen-lin, WU Ying-lei, ZHANG Nian-ci
(Fish Disease Laboratory, Chinese Academy of Fishery Sciences, Huzhou 313001, China)

Abstract: The *Aeromonas hydrophila* strain BSK-10 was isolated from moribund crucian carp with motile aeromonad septicemia during the outbreaks in south China. An orthogonal design was employed to test the optimum condition for the strain growing. The results show that glucose and glycerin can improve the growth of the strain BSK-10 significantly and so do HPO_4^{2-} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} , but Cu^{2+} and Co^{2+}

本研究中无机离子对 BSK-10 的影响表明, HPO_4^{2-} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 对 BSK-10 生长有显著促进作用,而 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 则表现为抑制作用。而且,各种离子间存在复杂的交互作用,各种离子因 Na_2HPO_4 添加与否对 BSK-10 表现为不同的作用, Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 的促生长作用在 Na_2HPO_4 的存在时表现得极为明显;而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Mn^{2+} 在 Na_2HPO_4 存在时有轻微抑制作用,而不加 Na_2HPO_4 则表现促生长作用。除了 Na_2HPO_4 ,其他离子间也存在类似的交互关系。采用严格离子浓度控制的培养基,开展各种离子间的交互影响研究,不但对于指导高效菌苗的培养有较大意义,对于了解气单胞菌在自然生态环境中的变化情况,乃至了解不同水域的疾病发生规律,都是很有意义的。

参考文献:

- [1] 陈怀青,陆承平.家养鲤科鱼类暴发性传染病的病原研究[J].南京农业大学学报,1991,14(4):87-91.
- [2] 沈锦玉,陈月英,沈智华,等.浙江省养殖鱼类暴发性流行病病原的研究 I.嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)分离、致病性及生理生化特性[J].科技通报,1993,9(6):391-401.
- [3] 陈月英,钱冬,沈智华,等.养殖鱼类细菌性败血病的菌苗制备技术[J].水产学报,1996,20(2):125-131.
- [4] 陈月英,钱冬,沈智华,等.淡水鱼类细菌性败血症菌苗浸浴免疫研究[J].海洋与湖沼,1998,29(6):597-603.
- [5] 范红结,陈怀青,陆承平.用发酵罐制备嗜水气单胞菌疫苗用菌液培养条件的优化[J].中国兽药杂志,1998,32(2):11-13.
- [6] 杨纪珂,孙长鸣,汤旦林.应用生物统计[M].北京:科学出版社,1983.242-266.
- [7] 涂小林,陆承平.嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析[J].微生物学报,1992,32(6):432-438.
- [8] 李焕荣,陈怀青,陆承平.嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase54 的纯化及特性分析[J].南京农业大学学报,1996,19(3):88-94.

show inhabitance to the growth of strain BSK - 10. Na_2HPO_4 has cross effects with other ions such as Fe^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} which have significant enhancement effects on the strain with the existence of Na_2HPO_4 , while $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Mn^{2+} have slight enhancement with the existence of Na_2HPO_4 . The results also show that the effects of glucose are different on the growth of *Aeromonas* strains isolated from different resources of fish. The growth curve of BSK - 10 was on the basis of 25°C, 30°C and 35°C, showing 30°C was the optimum temperature with the longest logic growth and a maximum concentration of bacteria of $3.80 \times 10^8 \text{CFU/ml}$.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; BSK - 10; optimum culture; growth

欢迎订阅 2002 年《淡水渔业》

《淡水渔业》杂志由中国水产学会和长江水产研究所主办, 1971 年创刊。本刊为大 16 开, 64 页, 正文与封面纸张质量、印刷质量将有较大提高。刊登内容仍然以渔业实用生产技术为主, 适当报道具有实用价值的科研新成果及渔业动态信息, 更加贴近渔业生产, 贴近渔民。

《淡水渔业》2002 年为双月刊, 每单月 5 日出版, 每册定价 5.00 元, 全年 6 期 30.00 元。为方便广大读者, 仍采用 2 种订阅方式: ①可在当地邮局订阅, 邮发代号: 38 - 32, 国内统一刊号为 CN42 - 1138。②可直接汇款到杂志社订阅(随时可订阅全年杂志)。为感谢广大新老读者对本刊的厚爱, 凡订阅 2002 年《淡水渔业》杂志者, 凭订单复印件或汇款单, 可在本刊免费刊登 1 条供求信息(50 字以内)。

《淡水渔业》杂志社地址: 湖北省荆州市江汉北路

邮政编码: 434000

电话: (0716)8212277 - 3017

传真: (0716)8228212

欢迎新老读者订阅, 欢迎广大作者惠寄稿件, 欢迎新老客户刊登各种广告(本刊改为大 16 开后, 广告价格不变)。

欢迎订阅 2002 年《上海水产大学学报》

《上海水产大学学报》是上海水产大学主办的以水产科学技术为主的综合性学术刊物。主要反映各学科科研成果, 促进学术与教学研究的交流与繁荣。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、调查报告、研究简报、综述与评述、简讯等, 并酌登学术动态和重要书刊的评介等。

本刊为季刊, 大 16 开, 国内公开发行。每期单价: 6.00 元。国际标准刊号: ISSN1004 - 7271, 国内统一刊号: CN31 - 1613/S。国内邮发代号: 4 - 604, 国际发行代号: 4822Q。读者可在当地邮局订阅, 也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址: 上海军工路 334 号, 上海水产大学 38 号信箱

邮政编码: 200090 联系电话: (021)65710232 传真: (021)65680965

E - mail: xuebao@shfu.edu.cn