

提高耐盐红螺菌拮抗能力的发酵条件初探

李晓亮, 邱宏端, 黄秀丽

(福州大学生物科学与工程学院, 福建 福州 350002)

摘要: 以光合细菌培养基为基础, 初步探讨提高耐盐红螺菌拮抗能力的培养基组分等发酵条件, 结果表明培养基的最佳碳源为葡萄糖, 最佳氮源为磷酸氢二铵, 并在培养基中应缺省硫酸锰和氯化钙。以优化后的培养基培养耐盐红螺菌, 最低抑菌浓度达 $32 \text{ AU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 较原光合细菌基础培养基提高了大约 1 倍。添加聚乙二醇 400、D- 山梨醇表面活性剂不能提高该菌的拮抗能力。

关键词: 耐盐红螺菌; 拮抗; 培养基; 发酵条件

中图分类号: Q 93- 335; S 969. 38

文献标识码: A

A preliminary study on the improvement of antagonistic efficiency of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

LI Xiaoliang, QIU Hongduan, HUANG Xiuli

(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Culture conditions to improve the antagonistic efficiency of the bacteria were investigated using the photosynthetic bacteria medium. It was found that the optimum carbon source was glucose, the optimum nitrogen source $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, and $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ and CaCl_2 to be eliminated in the medium. The minimum inhibitory concentration on the *Rhodospirillaceae* under the optimized conditions was 32 AU mL^{-1} , doubled from the original medium. However, there was no effect on the antagonism by the addition of surfactants PEG and D-sorbitol.

Key words: salt-resistant bacteria; *Rhodospirillaceae*; antagonism; medium; culture condition

红螺菌科光合细菌在水产养殖中具有净化水质、促进动物生长与减少动物病害的作用, 是国内外致力于开发且常用的微生态菌剂。红螺菌可分泌拮抗物质, 与化学药品和抗生素相比, 红螺菌分泌的拮抗物质不但可以减少和阻止病原菌的感染, 而且还能有效解决耐药性的问题。因此, 开展提高红螺菌拮抗物质的分泌产量研究具有重要意义。近年来, 关于光合菌具有直接拮抗功能的研究已有一些进展, 如黄美珍报道了光合细菌对于致病弧菌具有抑制作用^[1]; 我们前期研究了 4 株红螺菌对 20 多株水产养殖病原菌的抑制作用, 表明耐盐红螺菌具有抑制病原菌作用, 其拮抗物质在菌种培养 7 d 后, 细胞进入生长稳定期与衰亡期时分泌量最大^[2], 并且初步研究了耐盐红螺菌拮抗物质的分离纯化和表征^[3]。本文以前期实验室筛选保存的耐盐红螺菌为拮抗菌种, 就提高红螺菌拮抗能力的培养基成分及发酵条件进行了优化, 以期为促进红螺菌药物在生物防治水产养殖病害中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

耐盐红螺菌: 荚膜红假单胞菌 (*Rps. capsulata*)^[4]; 指示病原菌: 温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*, ALPB), 均为本实验室保存菌种。

1.2 培养基

光合细菌培养基^[5]: 醋酸钠 3.0 g, 丙酸钠 0.3 g, 氯化钠 1.0 g, 硫酸铵 0.3 g, 硫酸镁 0.2 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.3 g, 氯化钙 0.05 g, 酵母膏 0.1 g, 硫酸锰 0.002 5 g, 硫酸亚铁 0.005 g, 蛋白胨 0.01 g, 谷氨酸 0.000 2 g, pH 7.4, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

营养琼脂培养与肉汤培养基^[6]: 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 氯化钠 5.0 g, pH 7.0~ 7.2, 蒸馏水定容至 1 000 mL; 营养琼脂培养基则在上述培养基中加入 1.5%~ 2.0% 琼脂。

收稿日期: 2007- 01- 16 初稿; 2007- 04- 01 修改稿

作者简介: 李晓亮 (1981-), 男, 硕士研究生, 从事微生物遗传育种研究工作 (E-mail: lixiaoliang5185@163.com)。

通讯作者: 邱宏端 (1955-), 女, 教授, 从事应用微生物研究 (E-mail: hongduanq@163.com)。

1.3 试验器材

一次性细菌微孔膜过滤器 (膜孔径 0.15 μm, 上海亚东核级树脂有限公司), 高速离心机 (AvantiTM J- 251, 美国 BECKMAN 公司), 生化培养箱 (LRH- 190, 广东省医疗器械厂), 光照度计 (JD- 3, 上海嘉定学联仪表厂), 可见分光光度计 (SP- 1105, 上海光谱仪器有限公司), 电子天平 (BL150, BL150S, 德国 SARTORIUS 公司) 等。

1.4 试验方法

1.4.1 耐盐红螺菌去细胞上清液 (CFS) 的制备

耐盐红螺菌接种于液体培养基中, 在 30℃、光照强度 815~ 840 lx 下培养 7 d, 将发酵液离心 (12 000 r·min⁻¹, 20 min), 吸取上清液用微孔滤膜过滤, 最后收集滤液无菌检验后备用^[7]。

1.4.2 拮抗能力的测定 琼脂纸片扩散法^[3]: 将病原菌培养至对数生长期, 制成菌体浓度为 1.5×10⁸~ 2.5×10⁸ CFU·mL⁻¹的菌悬液, 涂布, 置 30℃恒温箱中平衡干燥 30 min, 后立即将无菌滤纸片 (Φ6 mm) 贴于平板上, 滴加 10 μL 耐盐红螺菌 CFS 原液, 置于 30℃下培养 24 h 后, 用千分尺测量抑菌圈直径。最低抑菌浓度测定: 将耐盐红螺菌 CFS 按 2 倍稀释法稀释成一定倍数, 以琼脂纸片扩散法测定其对病原菌的抑菌活性, 以肉眼观察到有抑菌圈的最高稀释度的倒数为最低抑菌浓度 (MIC, AU·mL⁻¹)^[8]。

1.4.3 耐盐红螺菌生长情况的检测 浊度法: 细菌悬液的浊度与菌数有正比的关系^[6]。本实验室在前期研究中证明耐盐红螺菌在 660 nm 处有最大吸收, 故以耐盐红螺菌在 660 nm 的吸光度 (OD₆₆₀) 作为检测菌体生长的标准, 参比对照为相应未接种的培养基。

1.4.4 培养基组分的优化 以光合细菌培养基为基础培养基, 在不改变 pH 值 (7.4) 的条件下, 分别研究碳源、氮源、微量元素、表面活性剂等对耐盐红螺菌生长及其拮抗能力的影响。

碳源: 微生物对碳源利用的好坏, 将直接影响微生物的生长与代谢作用。本试验以葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、柠檬酸钠、草酸钠、四水合酒石酸钾钠代替基础培养基中的乙酸钠 (添加量为 0.3%), 分别制备培养基, 灭菌后接种 10% 红螺菌种液, 于 30℃、光照强度 815~ 840 lx 下培养 (菌体培养方法下同)。在培养过程中跟踪测定各种培养基的菌体生长曲线, 然后选择菌体生长良好的碳源进行抑菌试验, 研究不同的碳源对耐盐红螺菌

生长和抑菌效果的影响。

氮源: 氮源也是影响微生物生长与代谢的重要营养物质。本试验以磷酸氢二铵、磷酸二氢铵、谷氨酸、氯化铵、硝酸铵、蛋白胨代替基础培养基中的硫酸铵进行试验 (添加量为 0.03%), 在跟踪测定菌体生长曲线后选用生长较好的氮源进行抑菌试验, 研究不同氮源对耐盐红螺菌生长和抑菌效果的影响。

微量元素: 基础培养基中的微量元素有硫酸亚铁、硫酸镁、氯化钙、蛋白胨、谷氨酸、酵母膏、硫酸锰。本试验采用分别除掉其中一个微量元素进行菌体培养和抑菌处理, 探讨光合细菌基础培养基中的各种微量元素对耐盐红螺菌拮抗能力的影响。

表面活性剂: 有文献报道^[9], 表面活性剂可刺激细菌拮抗物质的产生及提高产量, 因此在基础培养基中, 分别加入 0.1% 的聚乙二醇 400、D- 山梨醇表面活性剂培养菌体, 并与基础培养基比较, 衡量添加后菌体生长及抑菌的效果。

1.4.5 温度和光照对拮抗能力的影响 将耐盐红螺菌接种于基础培养基中, 分别于不同温度 (25℃、30℃、37℃) 下, 光照 (815~ 840 lx) 培养 7 d 和置于 30℃下光照 (815~ 840 lx) 与无光照条件下培养 7 d, 进行耐盐红螺菌生长曲线和抑菌效果的测定。

2 结果与分析

2.1 培养基组分对耐盐红螺菌生长和抑菌效果的影响

2.1.1 碳源 从图 1 可以看出, 耐盐红螺菌对可溶性淀粉、葡萄糖利用较乙酸钠好, 柠檬酸钠处理的菌体虽可利用, 但生长较差, 四水合酒石酸钾钠、草酸钠、乳糖几乎不能利用。因此, 可选择可溶性淀粉和葡萄糖作为碳源培养基, 制备 CFS 进行抑菌试验。结果 (表 1) 表明, 可溶性淀粉为碳源的最低抑菌浓度没有改变, 而葡萄糖作碳源达 32 AU·mL⁻¹, 较原培养基提高了 1 倍, 因此选择葡萄糖为有利于耐盐红螺菌产拮抗物质的碳源。

表 1 不同碳源对红螺菌抑菌效果的影响

Table 1 Effect of carbon sources on antagonistic ability of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

碳源	乙酸钠 (基础培养基)	可溶性 淀粉	葡萄糖
抑菌圈直径 (mm)	8.0	8.4	9.2
最低抑菌浓度 (AU·mL ⁻¹)	16	16	32

2.1.2 氮源 从图 2 可以看出,耐盐红螺菌在以磷酸氢二铵、氯化铵为氮源的培养基中生长较好。抑菌试验结果显示 (表 2),3 种培养基最低抑菌浓

度均为 $16\text{ AU}\cdot\text{mL}^{-1}$,但从抑菌圈直径数据看,磷酸氢二铵抑菌圈最大,因此选择磷酸氢二铵更有利于提高耐盐红螺菌拮抗能力。

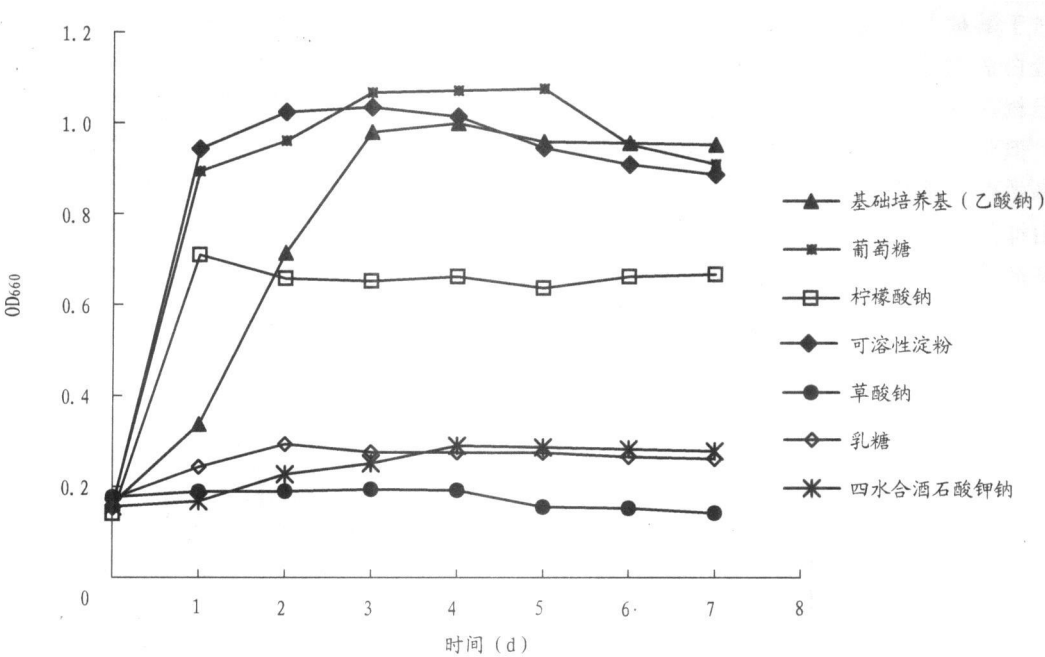


图 1 不同碳源对耐盐红螺菌生长的影响
Fig 1 Effect of carbon sources on the growth of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

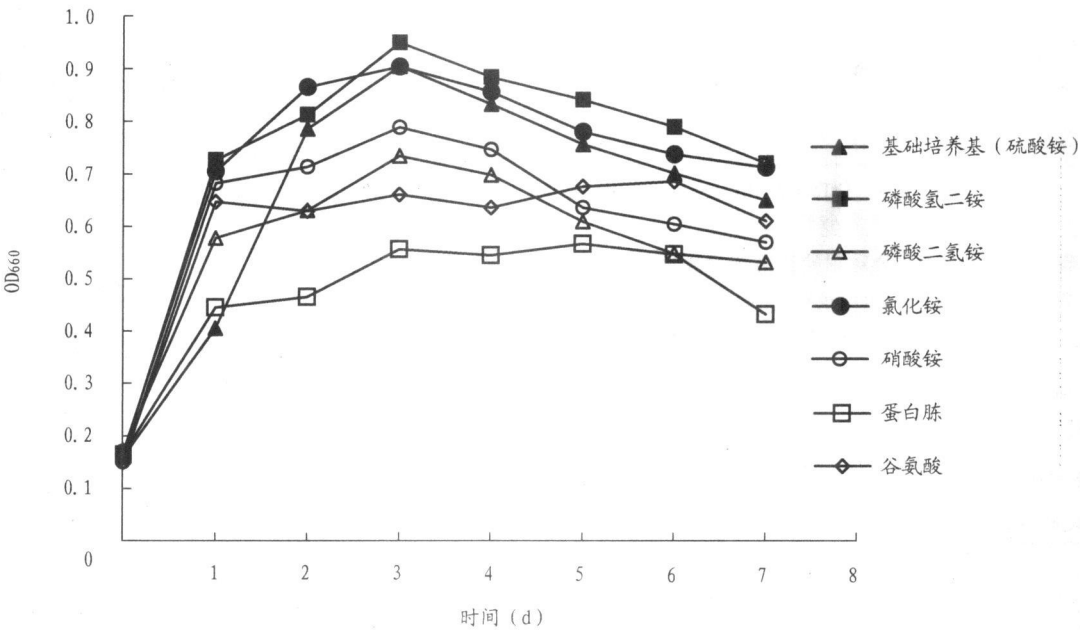


图 2 不同碳源对红螺菌抑菌效果的影响
Fig 2 Effect of nitrogen sources on the growth of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

2.1.3 微量元素 从图 3 中可以看出,基础培养基中缺少硫酸亚铁,红螺菌生长不好,其最高 OD₆₆₀ 值不超过 0.3,因此可确定硫酸亚铁为耐盐

红螺菌必需的生长因子。而培养基中缺少硫酸锰、氯化钙成分后菌液 OD₆₆₀ 值还高于基础培养基,说明菌种在缺少这两种成分的培养基中比在基础培养

基中生长更好，推测可能因为基础培养基中添加了硫酸锰、氯化钙后， Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 同培养基中的 SO_4^{2+} 、 PO_4^{3+} 发生反应，生成了不利于耐盐红螺菌利用的难溶物 $Mn_3(PO_4)_2$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、 $CaSO_4$ 所导致。对于其他几种成分如硫酸镁、酵母膏、谷氨酸、蛋白胨缺少，菌液的 OD₆₆₀ 值较基础培养基低，但相差不大，说明这些成分虽不是必需的生长因子，但对于菌体生长也具有一定的作用，因此在培养基中也必须添加这些微量成分。

由抑菌试验结果（表 3）看出，缺少硫酸锰的培养基最低抑菌浓度与基础培养基一样，而缺少氯

化钙的培养基最低抑菌浓度为 $32 AU \cdot mL^{-1}$ 。因此，在优化培养基中不必添加硫酸锰和氯化钙成分。

表 2 不同氮源对红螺菌抑菌效果的影响
Table 2 Effect of nitrogen sources on antagonistic ability of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

氮源	硫酸铵 (基础培养基)	氯化铵	磷酸 氢二铵
抑菌圈直径(mm)	8.0	8.3	8.8
最低抑菌浓度(AU·mL ⁻¹)	16	16	16

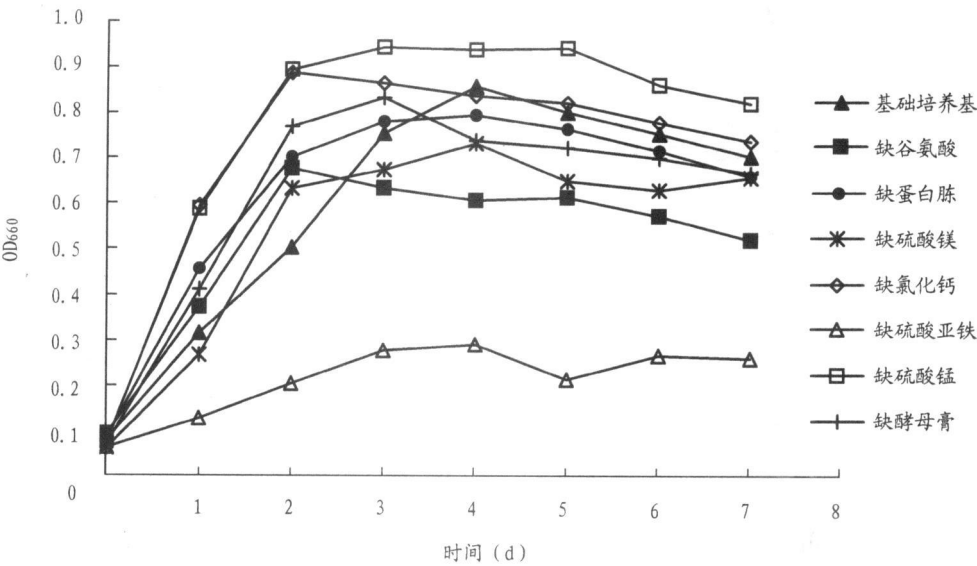


图 3 不同微量元素对耐盐红螺菌生长的影响
Fig 3 Effect of different microelements on the growth of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

表 3 缺少不同成分对耐盐红螺菌抑菌效果的影响

Table 3 Effect of lacking different microelements on antagonistic ability of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

氮源	硫酸铵 (基础培养基)	氯化铵	磷酸 氢二铵
抑菌圈直径(mm)	8.0	8.4	9.1
最低抑菌浓度(AU·mL ⁻¹)	16	16	32

2.1.4 表面活性剂 由图 4 可知，聚乙二醇 400、D-山梨醇对耐盐红螺菌生长影响不大，其抑菌试验结果也显示 3 种培养基抑菌圈大小无明显差异，说明这两种表面活性剂对耐盐红螺菌的生长和拮抗效果没有明显影响。

2.2 温度和光照对耐盐红螺菌生长及抑菌效果的影响

菌体的拮抗能力除了与菌株自身性质以及培养

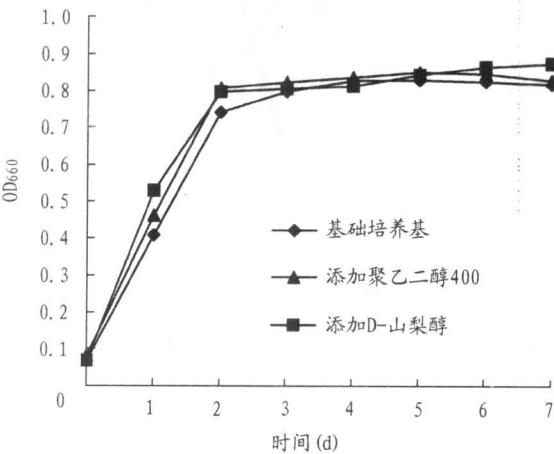


图 4 添加表面活性剂对菌体生长的影响
Fig 4 Effect of addition of surfactants on the growth of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

基有关外, 培养条件也有很大的影响。本试验就温度和光照条件对耐盐红螺菌的生长和抑菌效果进行探讨。由图 5 可知, 耐盐红螺菌在 25℃、30℃下生长差别不大, 在 37℃下生长稍差。抑菌试验结果表明 30℃抑菌圈直径与 25℃相差不大, 而 37℃的抑菌圈直径较前两者稍小。因此, 培养温度仍选择为 30℃。

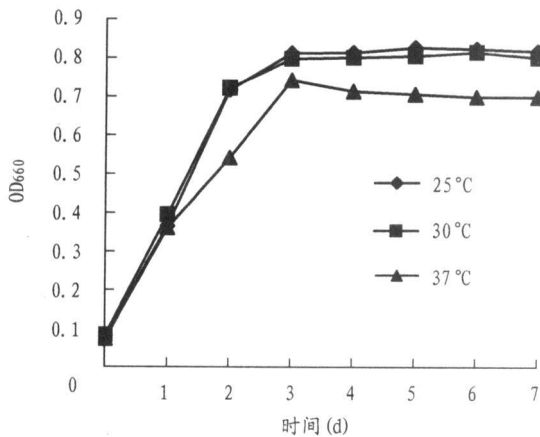


图 5 不同温度下红螺生长曲线

Fig 5 The growth curve of salt-resistant *Rhodospirillaceae* under different temperatures

由结果 (图 6) 看出耐盐红螺菌在光照下较无光照条件下生长好, 抑菌试验结果也表明光照培养抑菌圈直径比无光照更大。因此, 认为光照条件有利于提高耐盐红螺菌拮抗能力。

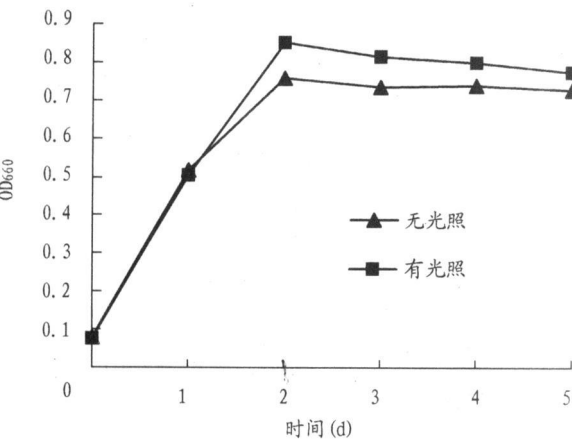


图 6 光照对耐盐红螺菌生长的影响

Fig 6 Effect of light exposure on the growth of salt-resistant *Rhodospirillaceae*

2 3 优化培养基对红螺菌的生长与抑菌效果

根据单因子试验初步得到优化培养基配方为每升水中葡萄糖 3.0 g、磷酸氢二铵 0.3 g、氯化钠 1.0 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.2 g、磷酸氢

二钾 0.3 g、硫酸亚铁 0.005 g、谷氨酸 0.000 2 g、酵母膏 0.1 g、蛋白胨 0.01 g, pH 7.4。优化的培养基与基础培养基分别接种耐盐红螺菌后于温度 30℃、光照强度为 815~ 840 lx 的条件下培养, 检测菌体生长曲线和抑菌效果。结果见图 7、表 4。

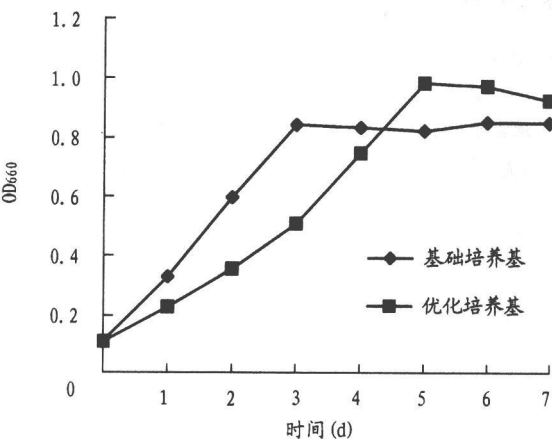


图 7 两种培养基中耐盐红螺菌的生长曲线

Fig 7 The growth curve of salt-resistant *Rhodospirillaceae* in two different media

表 4 两种培养基中耐盐红螺菌的抑菌效果

Table 4 Bacteria-inhibiting capacity of salt-resistant *Rhodospirillaceae* in two culture media

培养基	光合细菌 基础培养基	优化后的 培养基
抑菌圈直径 (mm)	8 2	10 2
最低抑菌浓度 (AU · mL ⁻¹)	16	32

从图 7 可以看出, 耐盐红螺菌在优化培养基中的 OD₆₆₀ 最高值比基础培养基要高, 可知菌体在优化培养基中生长状况更好。但在优化培养基中对数期明显变长, 推测原因可能是红螺菌由基础培养基转接到组分有所改变的优化培养基中时, 出现短暂的适应期所致。抑菌试验结果 (表 4) 表明: 基础培养基中的最低抑菌浓度为 16 AU · mL⁻¹, 而优化培养基中为 32 AU · mL⁻¹, 优化培养基中拮抗效果比原来的基础培养基提高了约 1 倍。

3 结 论

3 1 获得了更有利于耐盐红螺菌生长和提高抑菌效果的培养基, 配方为每升水中葡萄糖 3.0 g、磷酸氢二铵 0.3 g、氯化钠 1.0 g、磷酸二氢钾 0.5 g、硫酸镁 0.2 g、磷酸氢二钾 0.3 g、硫酸亚铁 0.005 g、谷氨酸 0.000 2 g、酵母膏 0.1 g、蛋白胨 0.01 g, pH 7.4。

3 2 证明表面活性剂对于提高耐盐红螺菌拮抗能力并无影响。

3 3 在光照条件下 30℃培养，优化培养基的拮抗能力比基础培养基提高了约 1 倍。

参考文献:

[1] 黄美珍. 光合细菌对致病弧菌的抑制作用 [J] . 台湾海峡, 1999, 18 (1): 92– 94.

[2] 邱宏端, 陈智伟, 袁重桂. 等. 耐盐红螺菌对水产养殖病原菌的拮抗作用 [J] . 水产学报, 2003, 27 (1): 69– 74.

[3] 邱宏端, 徐珊楠, 林娟, 等. 耐盐红螺菌拮抗物质的分离纯化及特性分析 [J] . 水产学报, 2005, 29 (3): 362– 366.

[4] 邱宏端, 郭养浩, 吴陵. 光合细菌的分离与生长特性初探 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 1999, 27 (2): 116– 120.

[5] 邱宏端, 腾蓉, 陈雷鸣, 等. 荚膜红假单胞菌应用型扩大培养液的优化实验 [J] . 大连水产学报, 2001, 16 (1): 29– 33.

[6] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭, 等. 环境工程微生物检验手册 [M] . 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 353.

[7] BENKERROUM N, GHOUATI Y, SANDINE W E, et al. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins [J] . Letters in Applied Microbiology, 1993, 17: 78– 81.

[8] BAREFOOT S F, KLAENHAMMER T R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* [J] . Appl Environ Microbiol, 1983, 45: 1808 – 1815.

[9] 吕燕妮, 李平兰, 周伟. 戊糖乳杆菌 31– 1 菌株产细菌素发酵条件优化 [J] . 微生物学通报, 2005, 32 (3): 13– 19.

(责任编辑: 刘新永)