

# 培养条件对养殖真鲷弧菌病病原菌毒素产生的影响

吴后波 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

**摘要:** 研究了温度、酸碱度、气体环境、营养成分及培养时间等培养条件对真鲷病原菌最小弧菌 *Vnr Pm* 毒素产生的影响。结果表明, 温度对 *Vnr Pm* 毒素的产生有显著影响, 在 30℃ 培养时产量最高; 当 pH 在弱碱性环境(7.2 左右)时, *Vnr Pm* 毒素产量最高; 振荡通气能极大地促进 *Vnr Pm* 毒素的产生, 显著提高其产量; *Vnr Pm* 毒素的产量随着培养时间的延长而逐步增加, 到 36h 即可达到最高水平, 并维持至 72h; 改良海水营养培养基与普通海水营养培养基相比, 更有利于毒素的产生, 毒素产量可提高 1 倍。

**关键词:** 真鲷弧菌病; 最小弧菌; *Vnr Pm* 毒素; 培养条件

中图分类号: S941.42 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)02-0119-03

弧菌病(Vibriosis)是华南沿海地区养殖真鲷中发生的主要细菌性疾病, 该病的暴发性流行给整个真鲷养殖业造成了巨大的经济损失。近年来在明确其病原菌是最小弧菌(*Vibrio mimicus*)的基础上<sup>[1]</sup>, 对最小弧菌的致病机理, 特别是该菌产生的外毒素进行了一系列的研究, 已经证实该菌在致病的过程中能产生一种外毒素, 这种外毒素为单一的多肽, 分子量为 30.456kD, 具有溶血性、细胞毒性和动物致死性等多种生物学活性, 该外毒素不同于最小弧菌产生的其他毒力因子, 作者将其命名为 *Vnr Pm* 毒素<sup>[2]</sup>。

为进一步弄清最小弧菌产生 *Vnr Pm* 毒素的环境调控机制, 在室内对培养条件如何影响 *Vnr Pm* 毒素的产生进行了一系列的研究, 本文报道了这一方面的研究结果。

## 1 材料与方法

**1.1 细菌的培养** 菌种最小弧菌 9663 株, 系从福建省平潭县某海水网箱养殖场患暴发性传染病的真鲷中分离到的强毒株, 可产生 *Vnr Pm* 毒素。

实验用培养基: (1) 普通海水营养琼脂成分: 牛

肉膏 3.0g, 蛋白胨 5.0g, 酵母浸膏 1.0g, 琼脂 20.0g, 陈海水 1000mL, pH 调至 7.2。(2) 改良普通海水营养琼脂成分: 牛肉膏 1.5g, 蛋白胨 2.5g, 酵母浸膏 0.5g, Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g, 琼脂 20.0g, 陈海水 1000mL, pH 调至 7.2。

病原菌接种固体普通海水营养培养基后, 30℃ 培养 24h。活化菌种接种液体普通海水营养培养基后, 30℃、200r/min 摆床培养 18—20h 制成种子液, 实验时按 1% 的比例移种至不同培养基, 在不同培养条件下培养。

**1.2 *Vnr Pm* 毒素产量的测定** 毒素的产量以溶血价表示。病原菌培养物 3mL 经 10000r/min 离心 30min, 取上清, 用 50mmol/L 的 PBS 缓冲液(pH7.4)在 96 孔板上倍比稀释, 然后加等量的 1% 的人红细胞, 于 37℃ 放置 1h, 再于 4℃ 放置 1h, 判断结果。以溶解 50% 的红细胞的最高稀释度为溶血价。

**1.3 培养温度对毒素产量的影响** 将接种了病原菌的普通海水营养培养基分别置于 4℃、20℃、30℃、37℃ 静置培养 24h 后, 检测毒素产量。试验重复 3 次。

**1.4 酸碱度对毒素产量的影响** 用 1mol/L NaOH

收稿日期: 2001-07-10; 修订日期: 2001-12-29

基金项目: 广东省“科技创新百项工程”资助项目 99B06201G; 中国科学院创新工程项目(KSCX 2-E04; 国家 863 计划资助项目 2001AA622050)

作者简介: 吴后波(1967—), 男, 湖北省洪湖市人; 博士, 副研究员; 研究方向: 海洋生物病害。E-mail: hb\_W@netease.com。本文在南京农业大学陆承平教授指导下完成, 谨致谢忱

或 HCl 将普通海水营养培养基的起始酸碱度分别调至 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0。灭菌后分别接种病原菌, 30℃ 静置培养 24h 后, 检测毒素产量。试验重复 3 次。

**1.5 气体环境对毒素产量的影响** 将病原菌接种普通海水营养培养基后, 分别在振荡通气(200r/min)、静置及厌氧(上覆一层液体石蜡)等气体环境下 30℃ 培养 24h 后, 检测毒素产量。试验重复 3 次。

**1.6 培养时间及培养基对毒素产量的影响** 将病原菌分别接种普通海水营养培养基及改良海水营养培养基, 30℃ 静置培养, 于接种 2h, 4h, 6h, 10h, 14h, 24h, 36h, 48h, 72h 后于同一试管内取样, 检测毒素产量。试验重复 3 次。

## 2 结 果

### 2.1 培养温度对毒素产量的影响

将接种了病原菌的普通海水营养培养基分别置于 4℃、20℃、30℃、37℃ 静置培养 24h 后, 检测毒素产量, 结果见图 1。由图 1 可知, 温度对病原菌毒素的产量有显著影响, 在 30℃ 培养时产量最高。

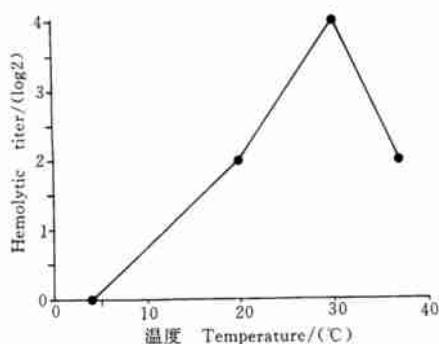


图 1 培养温度对毒素产量的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the production of toxin

### 2.2 酸碱度对毒素产量的影响

用 1mol/L NaOH 或 HCl 将普通海水营养培养基的起始酸碱度分别调至 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.5, 8.0, 灭菌后分别接种病原菌, 30℃ 静置培养 24h 后, 检测毒素产量, 结果见图 2。由图 2 可知, 当起始 pH 在弱碱性环境(7.2 左右)时, 病原菌毒素产量最高。

### 2.3 气体环境对毒素产量的影响

将病原菌接种普通海水营养培养基后, 分别在振荡通气、静置及厌氧等气体环境下 30℃ 培养 24h 后, 检测毒素的产量, 在振荡通气的情况下所产毒素的溶血价为 64, 而在静置的情况下溶血价为 16, 厌氧的情况下溶血价则更低, 为 4。由此可见, 振荡通气能极大地促进病原菌毒素的产生, 显著提高其产量。

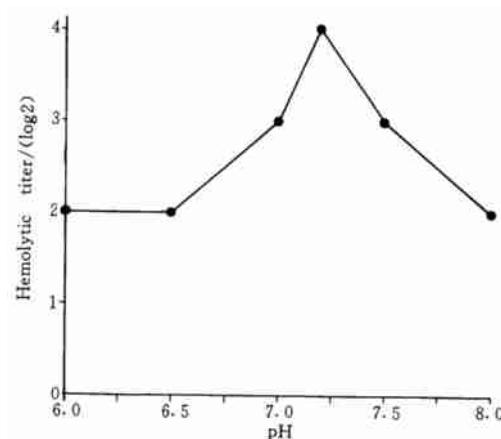


图 2 pH 对毒素产量的影响

Fig. 2 Effect of pH on the production of toxin

**2.4 培养时间及培养基对毒素产量的影响** 将病原菌分别接种普通海水营养培养基及改良海水营养培养基, 30℃ 静置培养, 接种后分别取样检测毒素产量, 结果见表 1。结果表明, 毒素的产量随着培养时间的延长而逐步增加, 到 36h 即可达到最高水平, 并至少维持至 72h。改良海水营养培养基与普通海水营养培养基相比, 更有利于毒素的产生, 产量可提高 1 倍。

表 1 培养时间和培养基对毒素产量的影响

Tab. 1 Effect of culture time and media on the production of toxin

培养时间 (h)	普通海水营养培养基	改良海水营养培养基
2	0	2
4	2	4
6	4	8
10	8	16
14	8	32
24	16	64
36	64	128
48	64	128
72	64	128

## 3 讨 论

环境因素对病原弧菌产生毒力因子的调控是当前病原弧菌研究中的一个热门课题。近年来, 对病原弧菌产生毒力因子的调控进行了大量的研究。Kothary 等人<sup>[3-5]</sup>证明病原性创伤弧菌产生蛋白酶的最佳时期是对数生长期, 培养基中需添加 2% 的胰蛋白胨, 1.5% 的氯化钠; 产生溶血素 VVH(*Vibrio vulnificus* hemolysin, VVH) 的最佳时间为创伤弧菌的对数生长期, 最佳培养基为 HIB 培养基(Heart infar-

sion broth), 高盐浓度能抑制溶血素的产生, 但高盐浓度对溶血素的活性没有影响<sup>[6]</sup>。Kreger 发现美人鱼弧菌 (*Vibrio damsela*) 产生细胞溶素的最佳时间是美人鱼弧菌对数生长期的中、后期<sup>[7]</sup>, 而且要求培养基中含有 0.5% 的  $\text{Na}^+$ , 当培养基中的  $\text{Na}^+$  浓度高于 0.8% 时, 细胞溶素的产量就会下降。Nishibuchi 等人证明培养条件对最小弧菌肠毒素的产生影响很大<sup>[8]</sup>, 利用不含葡萄糖、含 0.5% NaCl 的 TSB 培养基 (Tryptic soy broth) 培养最小弧菌, 不产生肠毒素, 而利用含 0.5% NaCl 的 BHI 培养基 (Brain heart infusion) 培养最小弧菌, 则产生大量的肠毒素。

改良海水营养培养基是在普通海水营养培养基的基础上添加了有利于外毒素产生的二价金属铁离子, 同时营养成分减半。改良培养基有利于毒素的产生。这说明铁离子在最小弧菌外毒素 Vnr Pm 的产生过程中起着重要作用, 这一点与其他弧菌外毒素产生的需铁机制一样, 同时也说明与其他致病弧菌一样<sup>[9]</sup>, 载铁体可能是最小弧菌的一个重要的致病因子。

#### 参考文献:

[ 1 ] Wu H B, Pan J P. The immune protective effects of three kinds of vaccination against vibriosis in maring cage cultured red sea bream

(*Pagrus major*) [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2002, **26**(5): 457—464[ 吴后波, 潘金培. 三种免疫制剂对真鲷弧菌病的免疫保护性. 水生生物学报, 2002, 26(5): 457—464]

- [ 2 ] Wu H B, Pan J P. Purification and characterization of the exotoxin Vnr Pm produced by *vibrio mimicus* [J]. *Oceanologia et Limnologia sinica*, **33**(1): 83—89[ 吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离、提纯及生物学活性. 海洋与湖沼, 2002, 33(1): 83—89]
- [ 3 ] Kothary M H, Kreger A S. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus* [J]. *Infect. Immun.*, 1985, **50**: 534—540
- [ 4 ] Kothary M H, Kreger A S. Purification and characterization of an extracellular cytolsin produced by *Vibrio damsela* [J]. *Infect. Immun.*, 1985, **49**: 25—31
- [ 5 ] Kothary M H, Kreger A S. Production and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus* [J]. *Journal of General Microbiology*, 1987, **133**: 1783—1791
- [ 6 ] Tison D L, Kelly M T. Factors affecting hemolysin production by *Vibrio vulnificus* [J]. *Curr. Microbiol.*, 1984, **10**: 181—184
- [ 7 ] Kreger A S. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela* [J]. *Infect. Immun.*, 1984, **44**: 326—331
- [ 8 ] Nishibuchi M, Seidler R J. Medium dependent production of extracellular enterotoxin by norr 01 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis* [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, **45**: 228—231
- [ 9 ] Amaro C, Gbiosa E, Fouz B, et al. Role of iron, capsule, and toxins in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus* biotype 2 for mice [J]. *Infect. Immun.*, 1994, **62**: 759—763

## EFFECTS OF CULTURAL CONDITIONS ON THE PRODUCTION OF TOXIN BY *VIBRIO MIMICUS*

WU Hour Bo and PAN Jirr Pei

(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301)

**Abstract:** In this article, effect of cultural conditions such as temperature, pH, air conditions, culture medium and incubation time on the yield of toxin VnrPm by *Vibrio mimicus* were studied. Temperature had significant influence on the toxin VnrPm production, the optimal temperature for toxin VnrPm production was 30 °C, and the optimal initial pH for the toxin VnrPm production was pH 6—8. The yield of toxin VnrPm was significantly enhanced when growing the strain with shaking. The yield of toxin VnrPm was the maximal during the mid- and late logarithmic growth phases (when the strain was incubated for 36 hours), and was stable during the stationary growth phase (incubated for 72 hours). The yield of toxin in the improved medium containing 0.1%  $\text{Fe}^{2+}$  was twice more than that in the ordinary marine water agar, the result demonstrated that the availability of free iron in the medium had a significant influence on the production of toxin VnrPm, and also the pathogenesis of *Vibrio mimicus*.

**Key words:** Vibriosis; Red sea bream(*Pagrus major*); *Vibrio mimicus*; Toxin VnrPm; Cultural conditions