

# 海洋费氏弧菌培养条件的研究

罗巅峰，王文妍，岳俊阳，方柏山\*

(华侨大学生物工程与技术系,福建 厦门 361021)

**摘要:**以本室保存的一株海洋费氏弧菌作为实验对象,采用单因素试验方法研究培养基起始pH值、盐浓度和摇瓶装液量等因素对菌株生长的影响,利用分光光度法测定其生长曲线,采用均匀设计方法,对该菌的培养基组分进行优化研究,确定其适合的生长条件,结果表明:当培养温度为30℃,通气量为180r/min时,该菌株在20h左右达到生长稳定期,对甘油的利用率要优于葡萄糖,盐浓度在5%以下时生长良好,最适装液量为60mL/250mL,培养液初始pH值为8.0。确定100mL培养基配方为:蛋白胨2g,酵母粉1.0g,氯化铵1.2g,氯化钠0.2g,磷酸二氢钾1.0g,此条件下可以得到最大的生物量。

**关键词:**费氏弧菌; 培养; 条件

中图分类号:X172 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1003-6504.2010.08.005 文章编号:1003-6504(2010)08-0020-04

## Culture Conditions of *Vibrio fischer*

LUO Dian-hui, WANG Wen-yan, YUE Jun-yang, FANG Bai-shan\*

(Department of Bioengineering and Biotechnology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Influences of initial pH, salinity and volume on *Vibrio fischer* were studied by single factor test respectively. Value of growth curve was drawn through spectrophotometer. Uniform design was used to confirm medium elements. Strain reached the growth of stable phase after 20h under the condition of rotating speed 180r/min and culture temperature 30℃. Glycerol was better carbon source than glucose and results showed that the strain was fit for the culture conditions of salinity no more than 5%, filling volume 60mL per flask 250mL, and initial pH 8.0. The optimal culture medium elements in 100mL were obtained by uniform design as peptone 2g, yeast 1.0g, NH<sub>4</sub>Cl 1.2g, NaCl 0.2g and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g.

**Key words:** *Vibrio fischer*; culture; condition

费氏弧菌(*Vibrio fischer*)是一种生长在海洋中的革兰氏阴性菌,普遍存在于海洋环境及海洋生物体中,是某些海洋鱼类的致病菌<sup>[1]</sup>。对费氏弧菌的日益重视源于它的发光现象,研究人员发现当菌群密度达到一定阈值时费氏弧菌会产生集体发光现象;后来的研究表明此生物发光现象是因为一自诱导剂的积累引起的;微生物通过该自诱导剂进行相互交流,启动相关基因的表达,从而引起微生物表型的变化<sup>[2-3]</sup>。任何对细胞代谢机制的抑制作用都会导致其发光的减少,所以费氏弧菌目前被普遍作为环境测试指标<sup>[4-6]</sup>。国外对费氏弧菌的研究已经有相当长的历史,而国内对此方面的报道还非常少<sup>[6-7]</sup>。本文主要研究了对该菌在实验室条件下的培养液配方优化及相关的一些培养条件探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种来源

本实验室保存(海洋三所惠赠)。

### 1.2 培养基

参照文献与弧菌的培养经验<sup>[8-10]</sup>,选择相应培养基如下:蛋白胨10g,酵母粉5g,NH<sub>4</sub>Cl 10g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5g,NaCl 5.0g,蒸馏水1000mL。

### 1.3 生长曲线的测定

从试管斜面挑菌株接种到已灭菌的装有50mL无菌培养基的250mL锥形瓶中,培养基配方见1.2节,置于30℃恒温摇床中、180r/min条件下培养至菌液浓度达到 $1\times 10^8$ cfu/mL,制成接种母液,后续各实验均以该浓度的母液进行接种。取接种液1.5mL,接入4瓶已灭菌的装有100mL培养液的250mL锥形瓶中,其中两组标记摇床培养,置于30℃恒温摇床中、180r/min条件下培养;另两组标记静置,室温静置培养;取无菌的培养基作为空白对照。每间隔2h测量OD值,根据

收稿日期:2009-08-07;修回2009-11-25

基金项目:国家自然科学基金项目资助(30770059);国务院侨办科研基金资助(07QZR07)

作者简介:罗巅峰(1977-),男,讲师,在读博士,从事生物大分子结构与合成生物学的研究,(手机)13159202805(电子信箱)lidianhui@163.com.cn;通讯作者,男,博士,教授,博士生导师,(电话)0592-2185869(电子信箱)fb@xmu.edu.cn。

所测得 OD 值,绘制生长曲线。

#### 1.4 甘油与葡萄糖对菌株生长的影响

为考察不同碳源对费氏弧菌生长的影响,在 1.2 节所示培养基中分别加入常见的两种碳源葡萄糖与甘油,进行比较。每隔 2 小时测量一次 OD 值,绘制生长曲线,观察甘油与葡萄糖对菌株生长的影响。

#### 1.5 均匀设计法调节培养基不同组分

经单因素考察,在 1.2 节所示培养基组成中,蛋白胨对菌株生长的影响与其他四种组分相比要小,所以以培养基中  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (X1)、 $\text{NaCl}$ (X2)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (X3)、酵母粉(X4)4 种组分作为考察因素,设计 4 因素 10 水平的均匀设计表,进行均匀设计试验<sup>[1]</sup>,并对结果进行回归分析,以获得最优的培养基组成配方。

表 1 四因素 10 水平均匀设计表  
Table 1 Factor and level of uniform design(g)

实验号	X1	X2	X3	X4
1	0.2	0.6	0.4	0.5
2	0.4	1.2	0.8	1
3	0.6	1.8	0.1	0.4
4	0.8	0.2	0.5	0.9
5	1	0.8	0.9	0.3
6	1.2	1.4	0.2	0.8
7	1.4	2	0.6	0.2
8	1.6	0.4	1	0.7
9	1.8	1	0.3	0.1
10	2.0	1.6	0.7	0.6

配 10 组液体培养基,每组均加入蛋白胨 2g,其余培养基组分按表 1 添加,补足蒸馏水至 100mL,装入 250mL 容量瓶中,121℃ 高温灭菌 20min 后,在超净工作台按 1% 装液量接入菌种,置于 30℃ 恒温摇床中、180r/min 条件下培养,每隔 1 小时取 1.5mL 菌液于 2mL 离心管离心称量其干重。

#### 1.6 盐度对费氏弧菌生长的影响

为了考察费氏弧菌对高盐的耐受程度,在 1.2 节所示培养基其他成分不变的前提下,大幅度改变其中  $\text{NaCl}$  浓度,探讨在不同  $\text{NaCl}$  浓度下费氏弧菌的生长情况,探索适合费氏弧菌生长的盐度范围。

表 2 培养基  $\text{NaCl}$  浓度梯度用量添加表  
Table 2  $\text{NaCl}$  concentration of culture medium

$\text{NaCl}$ 浓度(%)	实验组								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2	3	4	5	6	7	8	9	

#### 1.7 酸碱度对费氏弧菌生长的影响

探讨不同初始 pH 的培养环境对费氏弧菌的生长影响,找到最适合费氏弧菌生长的培养基初始 pH 值。按表 3 调节培养基的 pH 值,每隔 2 小时测一次 OD 值,观察菌群生长状态。

#### 1.8 装液量对费氏弧菌生长的影响

氧气是好氧微生物生长、繁殖及产物合成所必需的,

表 3 培养基 pH 梯度设计表  
Table 3 Beginning pH of culture medium

实验组									
pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4									

由于氧气在培养液中的溶解度极低,因而溶氧是影响发酵过程中的一个很重要的因素。摇瓶主要是通过装液量和摇床转速来控制溶氧。250mL 锥形瓶培养基装液量不同,对菌种生长速度的影响也不同。在 250mL 锥形瓶中分别装 20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL、100mL 培养基,监测其生长 OD 值变化,得到菌株的最适装液量。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 菌株的生长曲线

摇床培养的菌种在 1~4h 为生长延迟期,4~20h 为对数生长期,20~25h 为稳定期,25h 后为衰亡期,20h 时菌体密度达到最大,而后菌数缓慢的减少。

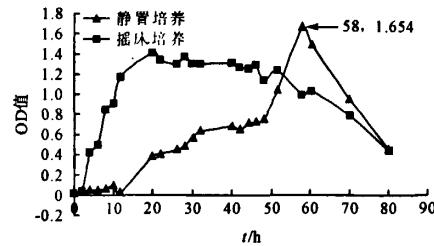


图 1 生长曲线  
Fig.1 Growth curve

静置培养的菌种在 1~10h 为生长延迟期,10~59h 为对数生长期,59~60h 为稳定期,60h 后为衰亡期。静置培养的菌密度最大值较摇床培养的最大值要高,但到达最大值所经历的时间较长。

#### 2.2 甘油与葡萄糖对菌株生长的影响

如图 2 所示,在每个生长时间段,加入甘油的菌液 OD 值,均稍大于加入葡萄糖的菌液 OD 值;但与未添加甘油与葡萄糖的菌株生长曲线相比,对菌株的生长影响不大,基本相似。所以在培养基的进一步优化中不加入额外碳源。

#### 2.3 均匀设计优化培养基组分

制备 10 组不同的培养基实验组,每组成分按表 2 4 因素 10 水平培养基成分用量表添加。每隔 1 小时测一次湿重,干重。1h 与 24h 的净干重结果如图 3 所示,生长 1h 后干重大致相同,生长 24h 后干重明显产生差别。

利用 DPS 软件对实验结果进行分析,得到拟合公式:

$$Y=0.000775+0.000124X_1-0.000092X_2+0.000101X_3+0.000117X_4$$

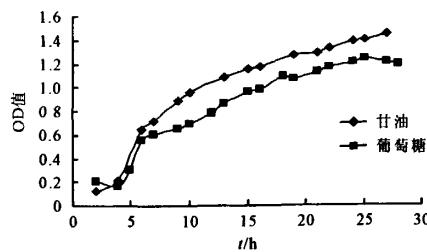


图2 甘油与葡萄糖对菌株生长的影响  
Fig.2 Effects of glycerol and glucose on the growth of strain

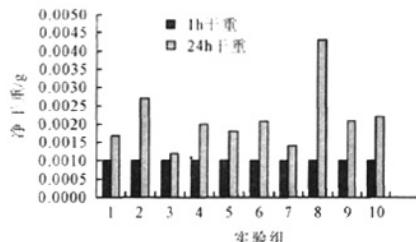


图3 菌株生长1h与24h的净干重  
Fig.3 Pure weight of stains after 1 and 24 hours

其中  $X_1$  为  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $X_2$  为  $\text{NaCl}$ ,  $X_3$  为  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $X_4$  为酵母粉。

通过预测，当培养基中添加  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.2g,  $\text{NaCl}$  0.2g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0g, 酵母粉 1.0g 的时候，将得到最大的理论产量 0.0041g 干重。按此配方进行验证试验，得到实际产量为 0.0043g。而采用文中 1.2 节所示培养基在同等条件下培养 24h 后收集菌体，产量只有 0.0023g，说明优化后的培养基可以得到更多的生物量。

#### 2.4. 盐度对费氏弧菌生长的影响

由图 4 可知盐度在 1%~5% 期间菌株生长较好，盐浓度为 6%~7% 时生长会发生延滞，所达到的最大菌体密度也较低，而盐浓度为 8%~9% 时生长被抑制。说明当菌株培养环境中的盐浓度大于 6% 时，将对菌株的生长造成不利影响。

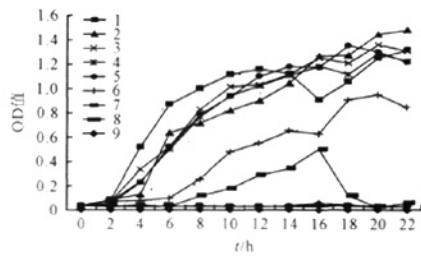


图4 不同NaCl浓度生长曲线  
Fig.4 Growth curves of strains in different salinity

#### 2.5. 酸碱度对费氏弧菌生长的影响

酸碱度对费氏弧菌生长的影响见图 5。当初始 pH 为 7~9 时菌株可以在最短的时间内进入对数生长期，过酸过碱性的条件都会导致延迟期增加。

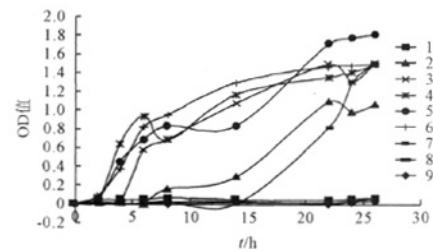


图5 酸碱度对费氏弧菌生长的影响  
Fig.5 Effects of pH on the growth of strain

当初始 pH 值为 8 的时候，26h 达到稳定期时菌液密度最大，菌液 OD 值达到 1.783。初始 pH 分别为 6, 7, 9~10 的四个实验组，在稳定期时都能达到同样的生长密度，但较初始 pH 为 8 的菌液密度要小。

当初始 pH 为 4, 11, 12 的时候，在 28h 内菌液密度几乎无变化，说明在此条件下不适合费氏弧菌生长。适合费氏弧菌生长的 pH 范围为 5~10。实验中发现初始 pH 为 10 的实验组，在培养的前 15 小时期间菌液密度变化不大，在 15 小时后突然快速生长然后达到最大值，这有可能是费氏弧菌在生长代谢过程中逐渐改变了培养基的酸碱性，使 pH 值趋近适合费氏弧菌生长的程度。

#### 2.6. 装液量对费氏弧菌生长的影响

装液量对菌株生长的影响如图 6 所示。对不同的装液量进行比较，装液量为 60mL 的菌体在达到稳定期时菌体密度最大。当装液量不断递增时，菌体密度在减少，当装液量达到 100mL 时菌体密度最小。250mL 锥形瓶装液量在 20~60mL 菌体生长差异不大，说明此时菌体生长需要的溶氧量和营养都能满足，其中 60mL 的装液量是最佳摇瓶装液量。

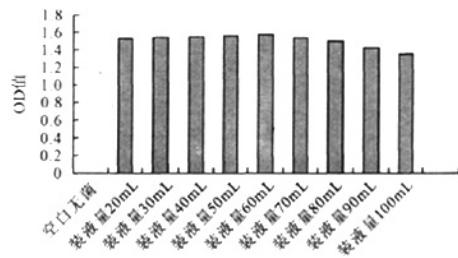


图6 装液量对菌液密度影响  
Fig.6 Effects of volume on the growth of strain

### 3 结论

从实验结果可以看出，培养时间、盐浓度、初始 pH 值、不同的培养基配方对菌体生长都有较大影响。费氏弧菌达到最大生长密度的时间大概为 20h 左右；维持最适生长的盐浓度在 5% 以下均可；培养基起始 pH 为 7~9 时适合菌体生长，最适 pH 为 8；在 250mL 锥形瓶

中摇床培养时装液量为 60mL 较为适合。经过均匀设计调节配方组分所得的最佳培养基配方为：蛋白胨 2g，酵母粉 1.0g，NH<sub>4</sub>Cl 1.2g，NaCl 0.2g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g，在此条件下费氏弧菌生长较好。

### [参考文献]

- [1] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 165–199.
- [2] Urbanowski ML, Lostroh CP, Greenberg EP. Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* luxR protein[J]. J Bacteriol, 2004, 186: 631–637.
- [3] Qin N, Callahan S, Dunlap P et al. Analysis of luxR regulon gene expression during quorum sensing in *Vibrio fischeri* [J]. J Bacteriol, 2007, 189: 4127–4134.
- [4] Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 254: 1–11.
- [5] Dunlap PV, Kuo A. Cell density dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein[J]. J. Bacteriol, 1992, 174: 2440–2448.
- [6] Schmitz A, Galas DJ. The interaction of RNA polymerase and Lac repressor with the lac control region[J]. Nucleic Acids Res, 1979, 6: 111–137.
- [7] 陶金莉, 迟莉丽, 沈亚领, 等. 细菌的群体行为调控机制—
- (上接第 19 页)
- [5] 刘晶晶, 汪萍, 王欢. 一株异养硝化-好氧反硝化菌的脱氮性能研究[J]. 环境科学研究, 2008, 21(3): 121–125.  
Liu Jing-jing, Wang Ping, Wang Huan. Study on denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier[J]. Research of Environmental Science, 2008, 21(3): 121–125. (in Chinese)
- [6] 李慧颖, 黄少斌, 范利荣. 一株好氧反硝化菌的反硝化性能研究[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(8): 9–12.  
Li Hui-ying, Huang Shao-bing, Fan Li-rong. Denitrification characteristics of an aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas putida* Strain A1[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(8): 9–12. (in Chinese)
- [7] Park K Y, Inamori Y, Mizuochi M, et al. Emission and control of nitrous oxide from a biological wastewater treatment system with intermittent aeration[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(3): 247–252.
- [8] Patureau D, Zumstein E, Delgenes P, et al. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems[J]. Microb Ecol, 2000, 39: 145–152.
- [9] 刘晶晶, 汪萍, 马洁峰. 一株产生低水平量 N<sub>2</sub>O 的好氧反硝化菌[J]. 环境科学与技术, 2008, 31(5): 26–29.  
Liu Jing-jing, Wang Ping, Ma Jie-feng. An aerobic denitrifier with low levels production of nitrous oxide[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 31(5): 26–29. (in Chinese)
- [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [11] 刘俊女, 汪萍, 马洁峰. GC-ECD 方法测定废水生物脱氮释放的 N<sub>2</sub>O[J]. 环境化学, 2006, 25(3): 377–378.  
Liu Jun-nv, Wang Ping, Ma Jie-feng. Study on GC-ECD method for determination of N<sub>2</sub>O in the nitrogen removing of wastewater[J]. Environmental Chemistry, 2006, 25(3): 377–378. (in Chinese)
- [12] 张小玲. 反硝化菌 DNF409 水体脱氮规律研究及其 narG 基因的中断[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.  
Zhang Xiao-ling. Study on the Denitrification Characteristics of a Denitrifier DNF409 and Its narG Gene Disruption[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [13] Hung-Soo Joo, Mitsuyo Hirai, Makoto Shoda. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No.4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(2): 184–191.