

枯草芽孢杆菌 B115 优化培养及其对气单胞菌的抗菌效果的研究*

沈智华 沈锦玉 尹文林 潘晓艺 吴颖蕾

(浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

摘要: 采用正交实验设计确定了枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B115 的基础培养基成份为: 胰蛋白胨 1%, 酵母膏 0.25%, 氯化钠 0.5%; 添加成份最优组合为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, $(\text{K}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4)$ (1.4 + 0.6)% 和柠檬酸三钠 0.1%; 添加成分最优组合与基础培养基培养产量比较, 表明添加 K^+ 、 NH_4^+ 和柠檬酸三钠能极显著地促进 B115 的生长。研究了 B115 对致病性气单胞菌的抗菌效果, 结果表明: B115 对 BSK-10 和 CL990920 有明显抑、杀菌效果, 对 TL970424 无抑菌效果。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 优化培养, 气单胞菌, 抗菌效果

中图分类号: S93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0079-06

Study on the Optimum Culture for Growth of *Bacillus Subtilis* B115 and the Antibacterial Effect of B115 on *Aeromonas**

SHEN Zhi-Hua SHEN Jin-Yu YIN Wen-Lin PAN Xiao-Yi WU Ying-Lei

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

Abstract: The essential medium of B115 composed of 1% tryptone, 0.25% yeast extract and 0.5% sodium chloride was determined by using an orthogonal design. The orthogonal design was also employed in testing the optimum additions. It was composed of 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.4% K_2HPO_4 , 0.6% KH_2PO_4 and 0.1% $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. The yield of B115 cultured in optimum medium was compared with the one in essential medium. Statistic analysis showed that the growth of B115 was most significantly improved by adding K^+ , NH_4^+ and $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ to essential medium. The antibacterial effect of *Bacillus subtilis* strain B115 on pathogenic *Aeromonas* was studied. The results showed different antibacterial effects of B115 on different aeromonads. There were obvious antibacterial effects on BSK-10 and CL990920, while no effect on the growth of TL970424.

Key words: *Bacillus subtilis*, Optimum culture, *Aeromonas*, Antibacterial effect

利用益生菌改善水产养殖动物体内外生态环境、减少疾病的发生, 已成为近年来我国水产养殖业中病害防治的一个趋势。芽孢杆菌作为益生菌制剂中的一大类, 因其具有抑制有害菌的生长、维持和调整肠道微生态平衡、改善养殖水体的生态环境, 同时其产生的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等具有提高饲料利用率、促进动物生长等特性, 在水产养殖中作为水体改良剂和饲料添加剂已得到越来越广泛的应用。为提高枯草芽孢杆菌单位体积的培养效率和研究其对致病菌的抗菌效果, 开展了枯草芽孢杆菌 B115 优化培养及其与致病性气单胞菌的相互作用的研究。

* 浙江省重大攻关项目 (No. 021102539)

通讯作者 Tel: 0572-2045132, E-mail: zjszh@163.com

收稿日期: 2004-10-13, 修回日期: 2005-01-21

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验菌株：枯草芽孢杆菌 B115，由本实验室分离自池塘淤泥。银鲫细菌性败血症病原菌 BSK-10、甲鱼气单胞菌病原菌 TL970424、河蟹气单胞菌病原菌 CL990920，均由本实验室从患病样品中分离到。实验设备：THZ-C 恒温振荡器，721 分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌 B115 培养液菌浓度测定：制备一系列浓度梯度的菌液，用分光光度计测定 OD_{660} 值，以平板计数法计数细菌，建立 OD 值与细菌浓度标准曲线。测定菌浓度时，稀释待测液使 OD_{660} 值在 0.10 ~ 0.70 之间。

1.2.2 气单胞菌培养液菌浓度的测定：按公式 $Y = (18.76 \times OD_{560} - 0.73) \times \text{稀释倍数}^{[1]}$ 计数。

1.2.3 B115 培养上清抑菌活性的测定：挑取 BSK-10 单菌落于 29℃，150r/min，培养 18h 后，以 LB 培养液稀释至 2×10^6 cfu/mL，吸 0.1mL 涂布于 LB 平板上，无菌打孔，待用。取待测 B115 培养液 1mL 于 4℃，8,500r/min，离心后，取上清。每孔中加入 150μL B115 培养上清，于 29℃ 培养 24h，测量抑菌圈大小。

1.2.4 B115 培养基基础成份的设计：对培养基基础成份胰蛋白胨、酵母膏、NaCl 和葡萄糖各高中低三水平运用正交设计法^[2]，确定最适使用量。

1.2.5 B115 培养基添加成份最适量的设计：采用正交设计法在基础培养基中加入不同水平的 K^+ 、 NH_4^+ 和柠檬酸三钠，确定最优添加量组合^[3]。比较最优添加量组合与基础培养基对细菌产量、抑菌活性和 pH 的影响。

1.2.6 B115 对致病性气单胞菌的抑菌效果预试验：分别挑取致病菌和 B115 单菌落于 LB 培养液 29℃，150r/min 培养 18h，将致病菌培养液稀释至 2×10^6 cfu/mL，取 0.1mL 涂布于平板，滴加 10μL B115 菌液，于 29℃ 培养 24h，观察抑菌圈大小。

1.2.7 混合培养法检测 B115 对致病性气单胞菌的抑、杀菌作用：用 LB 培养液将 B115 纯培养菌液稀释至 10^4 cfu/mL，致病菌稀释至 10^4 、 10^3 和 10^2 cfu/mL。各取 2mL 混合，150r/min，29℃ 培养。并设致病菌和 B115 的纯培养作对照。分别于 6h 和 24h 取样检测。将样液稀释至适当浓度，取 10μL 滴加于 BCB 和 SA 选择性平板^[4,5]，于 29℃ 培养，24h 后计数各菌落数。

2 结果与讨论

2.1 枯草芽孢杆菌培养液浓度的 OD_{660} 标准曲线

将菌浓度与 OD_{660} 值作线性回归，得到 $Y = (7.3086X + 0.0486) \times D$ ， $R = 0.9941$ ，其中：Y—细菌浓度，X— OD_{660} 值（范围在 0.10 ~ 0.70），D—稀释倍数。

2.2 B115 的优化培养

2.2.1 培养基基础成份对 B115 生长的影响：由表 1 可见，胰蛋白胨不同水平对培养液菌量高低影响较大，高浓度的胰蛋白胨产量最高，低水平的产量最低，极差为 18.3，而对 pH 和抑菌活性无影响，极差分别为 0.2 和 0.5。酵母膏不同水平对培养液菌量高

低也有所影响, 高水平的酵母膏产量最高, 但低水平 (0.25%) 组的产量反而较中水平组高, 中水平组的抑菌活性明显较低, 抑菌圈为 19.2mm, 分别较高低水平小 2.5mm 和 1.5mm, 三水平对 pH 无影响, 极差为 0.2。低水平的 NaCl (0.5%) 明显较中、高水平利于 B115 的生长, 极差为 12.2, 但对 pH 无影响, 对抑菌活性影响也不大。添加高水平葡萄糖 (1%) 不利于 B115 生长, 高水平的葡萄糖明显降低了菌产量和培养液的 pH 值, 中等水平的葡萄糖具有维持培养液 pH 稳定的作用, 对培养产量无影响, 但添加葡萄糖能明显提高培养上清的抑菌活性, 抑菌圈极差为 3.5mm, 不加葡萄糖的抑菌圈大小为 18.4mm, 比 1% 组和 0.5% 组分别小 3.5mm 和 2.8mm。

综合四因素不同水平的作用以及考虑到生产成本, 认为生产 B115 的基础培养基成份为: 胰蛋白胨 1%, 酵母膏 0.25%、氯化钠 0.5%。

表 1 培养基基础成份对枯草芽孢杆菌 B115 生长的影响

编号	胰蛋白胨 (%)	酵母膏 (%)	NaCl (%)	葡萄糖 (%)	菌量 (CFU/mL)	抑菌圈 (mm)	pH
1	2.0	1.00	1.00	1.0	45.68	22.3	6.0
2	2.0	0.50	0.75	0.5	47.87	20.7	7.0
3	2.0	0.25	0.50	0	61.02	18.0	8.4
4	1.0	1.00	0.75	0	48.20	20.8	8.5
5	1.0	0.50	0.50	1.0	41.84	20.5	6.0
6	1.0	0.25	1.00	0.5	41.07	21.0	7.0
7	0.5	1.00	0.50	0.5	47.98	21.9	7.0
8	0.5	0.50	1.00	0	27.59	16.5	8.4
9	0.5	0.25	0.75	1.0	23.97	23.0	5.6
菌量 (×10 ⁴ CFU/mL)	水平 1	51.5	47.3	38.1	37.2		
	水平 2	43.7	39.1	40.0	45.6		
	水平 3	33.2	42.0	50.3	45.6		
	极差	18.3	8.2	12.2	8.4		
抑 菌 圈 (mm)	水平 1	20.3	21.7	19.9	21.9		
	水平 2	20.8	19.2	21.5	21.2		
	水平 3	20.5	20.7	20.1	18.4		
	极差	0.5	2.5	1.6	3.5		
pH	水平 1	7.1	7.2	7.1	5.9		
	水平 2	7.2	7.1	7.0	7.0		
	水平 3	7.0	7.0	7.1	8.4		
	极差	0.2	0.2	0.1	2.5		

2.2.2 添加不同水平 NH₄⁺、K⁺ 和柠檬酸三钠对 B115 生长的影响: 由表 2 可见, 从细菌增殖角度观察, K⁺ 对 B115 生长的影响最大, 以中等水平的 K⁺ 添加量最有利于细菌增殖, 高水平的添加量反而不利于 B115 的生长, 其菌量极差为 20.3, 经方差分析, 得

$F = 8.972 > F_{0.05} = 5.143$, 表明 K^+ 不同水平间差异显著; NH_4^+ 和柠檬酸三钠三个水平的添加量之间无明显差异, 分别以低浓度和中浓度略优于其余两浓度, 三个水平的添加量之间略有差异, 极差分别为 6.1 和 4.2。从 B115 培养上清抑菌圈大小看, NH_4^+ 和柠檬酸三钠三个水平之间的差异不大, 极差分别为 1.1 和 0.5, 分别以低水平和高水平时的抑菌圈略大, K^+ 三个水平之间的差异稍大, 极差为 2.0, 低水平的抑菌圈较其余两水平大, 表明中高水平的 K^+ 对培养上清抑菌活性有负面影响。从 B115 培养液的 pH 看, NH_4^+ 和柠檬酸三钠对 B115 培养液的 pH 基本无影响, 极差为 0.1, K^+ 缓冲盐的浓度对培养液的 pH 影响较大, 极差为 1.3, 中高浓度的 K^+ 缓冲盐在一定程度上具有维持培养液 pH 稳定的作用, 尤以高浓度的 K^+ 缓冲盐。根据正交试验结果, 综合三因素三水平对 B115 增殖、抑菌活性及 pH 的影响, 确定三因素添加量的最优组合为: $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $(K_2HPO_4 + KH_2PO_4)$ (1.4 + 0.6)%, 柠檬酸三钠 0.1%。

表 2 添加不同水平 NH_4^+ 、 K^+ 和柠檬酸三钠对 B115 生长的影响

组别		$(NH_4)_2SO_4$ (%)	$(K_2HPO_4 + KH_2PO_4)$ (%)	柠檬酸三钠 (%)	菌量 (× 10^8 CFU/mL)	抑菌圈 (mm)	pH
菌量 (× 10^8 cfu/mL)	1	0.4	2.8 + 1.2	0.2	27.48	17.0	6.7
	2	0.4	1.4 + 0.6	0.1	56.53	17.0	7.2
	3	0.4	0.7 + 0.3	0.05	51.05	18.6	8.0
	4	0.2	2.8 + 1.2	0.1	43.48	17.3	6.7
	5	0.2	1.4 + 0.6	0.05	50.17	16.7	7.2
	6	0.2	0.7 + 0.3	0.2	49.95	20.0	8.0
	7	0.1	2.8 + 1.2	0.05	38.11	18.1	6.7
	8	0.1	1.4 + 0.6	0.2	63.22	18.3	7.5
	9	0.1	0.7 + 0.3	0.1	51.82	19.4	8.0
抑菌圈 (mm)	高	45.0	36.4	46.9			
	中	47.9	56.7	50.6			
	低	51.1	51.0	46.4			
	R	6.1	20.3	4.2			
pH	高	17.5	17.4	18.4			
	中	18.0	17.3	17.9			
	低	18.6	19.3	17.9			
	R	1.1	2.0	0.5			
菌量	高	7.3	6.7	7.4			
	中	7.3	7.3	7.3			
	低	7.4	8.0	7.3			
	R	0.1	1.3	0.1			

2.2.3 NH_4^+ 、 K^+ 和柠檬酸三钠三因素最优组合对 B115 生长的影响: 由表 3 可见, 基础培养基中添加 NH_4^+ 、 K^+ 和柠檬酸三钠后, B115 经 24h 培养后, 细菌产量为 (56.34

$\pm 0.88) \times 10^8 \text{ cfu/mL}$, 而基础培养基的细菌产量为 $(39.92 \pm 0.84) \times 10^8 \text{ cfu/mL}$, 根据成组数据 t 检验^[6], 得 $t = 25.435 > t_{10,0.01(22)} = 3.169$, 说明试验组细菌产量极显著高于对照组。添加三因素的试验组培养上清的抑菌圈为 18.0 ± 0.64 , 略低于对照组的 18.5 ± 1.03 , 无明显差异; 试验组的 pH 值为 7.2, 明显较对照组 8.5 低, 与 2.3.2 实验结果中添加高中浓度 K^+ 缓冲盐具有维持培养液 pH 稳定作用的结果一致。

通过基础培养基中各组成成份不同水平对 B115 生长影响的分析表明, 酵母膏使用量为 0.25% 时反而比使用量为 0.5% 时高, NaCl 使用量为 0.5% 时产量远高于 0.75% 和 1%, 从而确定了 B115 基础培养基中酵母膏和 NaCl 的使用量均为 LB 培养基中的一半, 大大降低了基础培养基成本, 减少了不必要的浪费; 从基础培养基成份正交实验中还看到: 添加葡萄糖不能提高菌产量, 添加 0.5% 的葡萄糖组与不加葡萄糖组菌产量一致, 添加 1% 的葡萄糖反而降低了菌产量, 但添加葡萄糖能明显提高 B115 培养上清的抗菌活性。说明添加葡萄糖很可能会增加 B115 抗菌物质的产生量或增强抗菌物质的活性, 并且从实验结果看到添加 0.5% 的葡萄糖具有稳定培养液 pH 值的作用, 因此, 在生产成本允许的情况下, 添加 0.5% 葡萄糖可在不影响单位细菌培养效率的情况下, 增强 B115 培养上清的抗菌活性, 这对于 B115 抗菌物质的研究具有一定意义。基础培养基中添加 NH_4^+ 、 K^+ 和柠檬酸三钠, B115 的产量增加了 42.4%。对 B115 优化培养的研究, 降低了生产成本, 提高了单位培养体积的产量。

表 3 NH_4^+ 、 K^+ 和柠檬酸三钠三因素最优组合对 B115 生长的影响

项目	菌量/ ($\times 10^8 \text{ cfu/mL}$)		抑菌圈 (mm)		pH 值	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
1	57.63	39.64	19.8	20.0	7.2	8.5
2	56.28	39.39	17.3	17.8	7.2	8.5
3	57.51	38.41	18.1	20.1	7.2	8.5
4	55.04	41.49	17.5	17.9	7.2	8.5
5	55.04	40.87	17.9	17.9	7.2	8.5
6	56.52	39.70	17.3	17.3	7.2	8.5
平均	56.34 ± 0.88	39.92 ± 0.84	18.0 ± 0.64	18.5 ± 1.03	7.2	8.5

2.3 B115 对致病菌的抑菌效果

B115 对 3 种致病菌的抑菌效果的预试验结果表明, B115 对 BSK-10 和 CI990920 有抑制作用, 且对 BSK-10 的抑菌圈略大于 CI990920, 但对 TL970424 无抑菌圈。为此进行了 B115 与 BSK-10 和 CI990920 混合培养的杀菌效果试验。

由表 4 可见, B115 与 BSK-10 混合培养时, BSK-10 的初始浓度与 B115 一致均为 5,000 cfu/mL 时, BSK-10 的生长不受 B115 的抑制, 24h 培养产物中 BSK-10 的含量与 BSK-10 纯培养浓度一致; BSK-10 的初始浓度为 B115 的 1/10 和 1/100 时, 6h 时计数结果表明: BSK-10 的生长基本不受 B115 的影响, 但至 24h 时未检测到 BSK-10 (最低检出值为 100cfu/mL), 说明 B115 对中、低浓度的 BSK-10 具有明显的杀灭作用。从 B115 生长角度看, 高浓度的 BSK-10 对 B115 的生长具有抑制作用, 24h 时 B115 的增殖倍数为对照的 1/1,200, 中、低浓度的 BSK-10 对 B115 的生长基本无影响。

由表 4 可见, B115 对中高浓度的 CL990920 具有明显的抑制作用, 且在 6h 时就已表现出来, 中高浓度的 CL990920 在 6h 时其增殖量分别为对照的 1/5 和 1/12, 至 24h 时为对照的 1/600 和 1/300; B115 对低浓度的 CL990920 有明显的杀灭作用, 6h 和 24h 时均未检出 CL990920 的存在, 可见 5000 cfu/mL 的 B115 对 50cfu/mL 的 CL990920 具有杀灭作用; 而 CL990920 对 B115 的生长基本无影响, 3 个浓度的 CL990920 与 B115 混合培养至 24h 后, B115 的含量与对照无明显差异。

表 4 B115 对 BSK-10 和 CL990920 的抑、杀菌效果

培养时间	细菌浓度	B115	BSK-10	B115	BSK-10	B115	BSK-10	B115 对照	BSK-10 对照**
0h	$\times$ cfu/mL	5000	5000	5000	500	5000	50	5000	5000
6h	$\times 10^3$ cfu/mL	3.5	8.5	11	1.25	8.5	0.2	9.5	20
24h	$\times 10^8$ cfu/mL	0.01	75	8.5	$<10^{-6}$ *	16	$<10^{-6}$ *	12	72
24h 增殖倍数		200	1.5×10^6	1.7×10^5	<0.2	3.2×10^5	<2	2.4×10^5	1.44×10^6
培养时间	细菌浓度	B115	CL990920	B115	CL990920	B115	CL990920	B115 对照	CL990920 对照**
0h	$\times$ cfu/mL	5000	5000	5000	500	5000	50	5000	5000
6h	$\times 10^5$ cfu/mL	11	2.5	10.5	0.5	8.5	$<10^{-3}$ *	10	25
24h	$\times 10^8$ cfu/mL	8	0.3	70	.015	8.5	$<10^{-6}$ *	11.5	90
24h 增殖倍数		1.6×10^5	6×10^3	1.4×10^5	3×10^3	1.7×10^5	<2	2.3×10^5	1.8×10^6

* 最低检出值为 100cfu/mL, ** BSK-10 和 CL990920 的对照只设初始浓度为 5,000cfu/mL 组。因以往实验结果表明, 初始浓度为 50 ~ 5000cfu/mL 的 BSK-10 或 CL990920 菌液, 经 24h 培养后产量无差异

气单胞菌广泛分布于水体环境中, 能够引起鲫、鳊、鲢、鳙等普通养殖鱼类及虾、蟹、鳖、蛙等特种水产动物的严重疾病^[7]。B115 与致病性气单胞菌混合培养的结果显示, B115 对鱼类细菌性败血症病原菌 BSK-10 以及河蟹气单胞菌致病菌 CL990920 具抑制作用, 但 B115 对甲鱼致病性气单胞菌 TL970424 无抑制作用。因此, 在养殖水体中施用枯草芽孢杆菌 B115 制剂对防治某些致病性气单胞菌引起的疾病具有一定的效果。

参考文献

- [1] 钱冬, 曹铮, 沈锦玉, 等. 中国水产科学, 2001, 8 (3): 38 ~ 44.
- [2] 徐如云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1985. 395 ~ 396.
- [3] 胡秉民, 张全德. 农业试验统计分析方法. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985. 194 ~ 205.
- [4] 陈天寿主编. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [5] Samuel A P, Felicisima M, Aaron C W, et al. Appl Environ Microbiol, 1985, 50 (4): 1027 ~ 1030.
- [6] 杜荣骞编. 生物统计学. 北京: 高等教育出版社, 1985. 123 ~ 129.
- [7] 沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 中国水产科学, 2000, 7 (3): 89 ~ 92.