

温度及 pH 对杀鲑气单胞菌生长的影响研究

田会芹¹, 李 贤², 傅松哲³, 任 香², 王顺奎⁴, 王先平⁴, 宋协法¹, 刘 鹰²

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266100; 2. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 南昌市疾病预防控制中心, 江西 南昌 330038; 4. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 利用 *A* 值法与活菌平板计数法, 测定了杀鲑气单胞菌在不同条件下的生长曲线, 研究了不同温度及 pH 对杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)生长的影响。结果表明, 活菌计数法更能真实的反映细菌数量的动态变化。在 28 °C, 15 °C, 10 °C, 5 °C 条件下, 随着温度降低, 杀鲑气单胞菌生长速率明显下降; 在 pH6.0~8.0 时, 酸性条件能明显抑制杀鲑气单胞菌的生长; 在 28 °C、pH7.5 条件下, 杀鲑气单胞菌生长速率最快, 达到稳定期时细菌数量也最多。在养殖生产过程中, 为了抑制杀鲑气单胞菌的生长繁殖, 建议在不影响鱼类正常生长的条件下, 尽量降低养殖水体温度并合理控制水体 pH, 以降低养殖鱼类发病率。

关键词: 杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*); 温度; pH; 生长

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)07-0007-06

doi: 10.11759/hyxx20140927002

杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)属于 Aeromonadacea 科、气单胞菌属(*Aeromonas*)。它分布范围广, 能引起鲑鳟鱼类患疔疮病^[1]。同时它也是一些其他水生动物疾病的原发性病原菌, 可感染大菱鲆^[2]、石鲈^[3]、刺参^[4]等。近几年, 随着中国鲑鳟鱼养殖产业的不断扩大, 杀鲑气单胞菌引起的病害问题随之出现。2007 年 10 月至 2008 年 3 月在成都市都江堰虹口深溪沟通威大西洋鲑流水养殖厂发生了大规模大西洋鲑体表皮肤肌肉溃疡病, 对养殖业者造成了严重损失^[5]。山东东方海洋科技股份有限公司工厂化循环水养殖的大西洋鲑也出现了不同程度的病害情况, 并从病鱼体内分离得到了杀鲑气单胞菌。为降低该菌对鲑鳟鱼类的危害, 有必要对其生长特性进行研究, 但目前相关研究尚未见报道^[6-7]。作者选择从养殖生产系统分离出的杀鲑气单胞菌菌株, 进行了不同温度及 pH 条件下的生长实验研究, 绘制了不同条件下杀鲑气单胞菌的生长曲线, 阐明了温度及 pH 对其生长的影响, 为在养殖生产过程中通过调控水体温度及 pH 等环境因子, 抑制杀鲑气单胞菌生长, 降低养殖鱼类发病率提供了理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*), 从山东东方海洋科技股份有限公司养殖的大西洋鲑患病个

体分离得到, 保藏于中国科学院海洋研究所实验室, 保藏编号是 CGMCC No. 7335。

1.2 培养基制备

(1) LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水 1 L, 121 °C, 15 min 灭菌。

(2) 2216E 琼脂: 青岛海博生物技术有限公司生产, 按配制说明配制。

1.3 实验方法

1.3.1 杀鲑气单胞菌的活化培养

将保藏的杀鲑气单胞菌接种于 2216E 琼脂平板上, 28 °C 恒温培养, 长出菌落后, 将单菌落接种于 100 mL 灭菌 LB 液体培养基中 180 r/min、28 °C 恒温培养 18 h 作为种子液。

1.3.2 不同温度下杀鲑气单胞菌生长实验

取 1.3.1 中所述种子液, 按 5% 接种量接种于 300 mL 无菌 LB 液体培养基中, 充分摇匀后分装成 3 份, 于 28 °C 下静置培养, 每隔 2 h 取样, 以无菌 LB 液体培养基作对照, 用紫外分光光度计检测菌液 A_{600} 值, 同

收稿日期: 2014-12-21; 修回日期: 2015-03-03

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003024); 国家科技支撑计划项目(2011BAD13B04); 国家自然科学基金项目(41306152)

作者简介: 田会芹(1990-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事鱼类病害预警与防控研究, 电话: 0532-82898031, E-mail: m15266209255@163.com; 宋协法, 通信作者, 男, 教授, 主要从事海洋渔业技术与养殖工程研究, E-mail: yuchuan@ouc.edu.cn; 刘鹰, 通信作者, 男, 研究员, 主要从事水产工程及生态学研究, E-mail: yinliu@qdio.ac.cn

时另取菌液进行梯度稀释, 于 2216E 琼脂平板涂布计数, 统计数据, 绘制其在该温度下的生长曲线。其他温度(15、10、5℃)梯度条件下实验方法类同。

1.3.3 不同 pH 条件下杀鲑气单胞菌生长实验

取 5 瓶 200 mL 灭菌 LB 液体培养基, 无菌操作, 用 1.0 mol/L NaOH 调节 pH 值分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 以 5% 接种量各接入相同浓度的种子液(同 1.3.1), 混匀后分装到已灭菌的试管中, 每支 10 mL, 做好标记, 置于 180 r/min、28 °C 恒温培养, 每隔 2 h 取出对应的试管, 测定菌液 A_{600} , 并在实验过程中定时检测菌液 pH 值。

1.4 数据分析

根据实验测得的 A_{600} 值及平板计数得到的细菌对数值, 绘制不同温度及 pH 条件下杀鲑气单胞菌生长曲线。用 SPSS18.0 软件对不同温度或 pH 值条件下培养相同时间的细菌数进行单因素方差分析 (Oneway ANOVA), 比较不同温度或 pH 条件对该菌生长的影响差异。

2 结果

2.1 不同温度下杀鲑气单胞菌的生长曲线

本实验采用了 A 值法与平板计数法相结合的方法,

对杀鲑气单胞菌生长曲线进行测定。结果显示, 在细菌对数生长期, 两种方法测得的生长曲线变化趋势基本一致, 但在细菌对数生长期之后, 菌液 A 值会继续增加, 而平板计数法显示细菌生长已进入稳定期甚至已经开始衰亡(图 1)。对两种方法进行比较发现, 在细菌生长对数期之后, 平板计数法更能真实反映细菌生长状态(详见 3.2)。实验发现, 不同温度下杀鲑气单胞菌生长曲线差异较大(图 2)。随着培养温度的降低, 杀鲑气单胞菌生长速率下降。当培养温度为 28 °C 时, 杀鲑气单胞菌在 2h 后就进入了对数生长期, 并在 8 h 左右达到数量高峰期, 为 6.6×10^8 CFU/mL。20 h 之后, CFU 对数值显示其数量开始下降(图 1a)。培养温度为 15 °C 时, 该菌在 6 h 之后进入快速增长期, 从 CFU 对数值可以看出, 在 48 h 左右细菌生长进入稳定期(图 1b)。当温度降低到 10 °C 时, 其生长速率进一步降低(图 1c), 14 h 左右生长速率加快, 54 h 趋于稳定。而当温度降低到 5 °C 时, 在 36 h 之内, 杀鲑气单胞菌数量无显著变化。经统计分析发现, 在实验第 24 小时和第 48 小时, 各温度组杀鲑气单胞菌数量均出现显著差异 ($P < 0.05$); 在第 72 小时, 15 °C 及 5 °C 条件下杀鲑气单胞菌数量差异显著 ($P < 0.05$), 说明随温度降低, 杀鲑气单胞菌生长速率显著降低(图 3)。

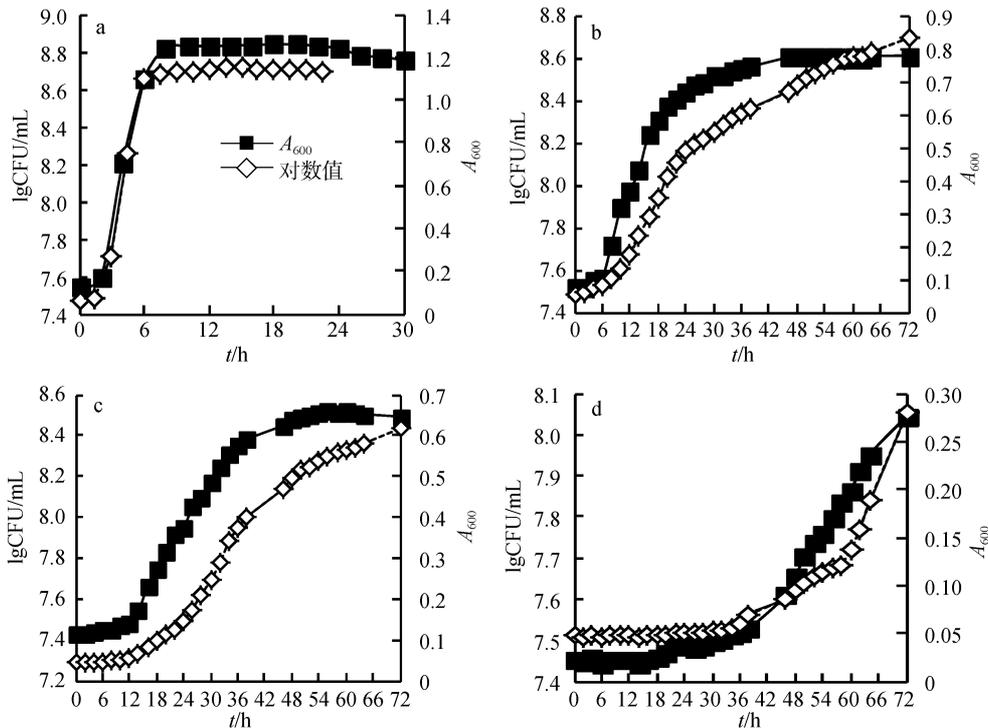


图 1 不同温度下杀鲑气单胞菌生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *Aeromonas salmonicida* under different temperatures
a. 28°C; b. 15°C; c. 10°C; d. 5°C

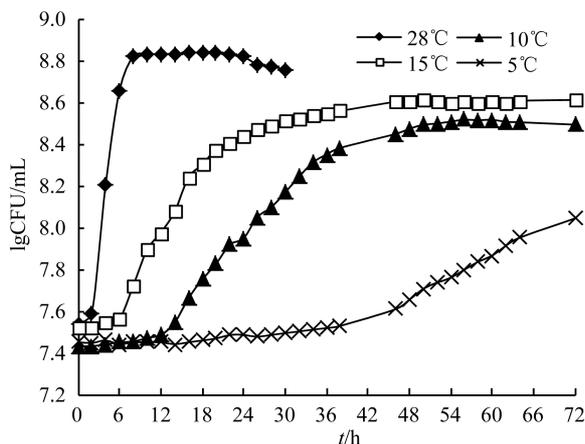


图2 不同温度下杀鲑气单胞菌生长曲线的比较

Fig.2 Comparison of *Aeromonas salmonicida* growth curves under different temperatures

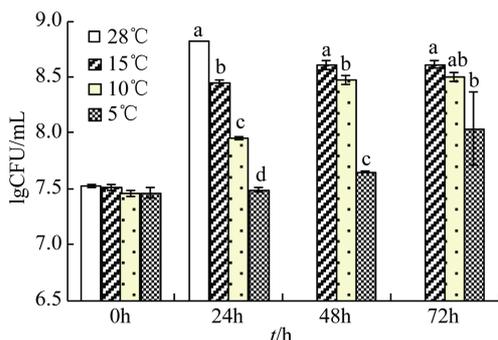


图3 杀鲑气单胞菌在不同温度下培养 24、48、72h 的细菌对数值

Fig. 3 Logarithm of *Aeromonas salmonicida* cultivated under different temperatures for 24, 48 and 72 h

2.2 不同 pH 条件下杀鲑气单胞菌的生长曲线

pH 是影响细菌生长的一个重要因素。实验结果表明, 培养液 pH 不同, 杀鲑气单胞菌生长速率差异显著, 且其在 pH6.0~8.0 范围内均可生长(图 4)。从生长曲线来看, 当初始 pH 为 7.5 时, 杀鲑气单胞菌在 6 h 左右进入对数生长期, 20 h 基本稳定, 菌液 A_{600} 值为 0.293。初始 pH 为 7.0 时细菌生长趋势与上述基本相同, 菌液 A_{600} 略低。当培养液初始 pH 为 8.0 时, 杀鲑气单胞菌生长速率及菌液 A_{600} 值均有所降低, 20 h 的 A_{600} 值为 0.245。当培养液显酸性, 即初始 pH 为 6 或 6.5 时, 细菌生长速率明显下降, 对数增长期延缓, 在 14 h 之后菌液 A_{600} 值才快速增加。对 12 h 及 24 h 时菌液 A_{600} 值进行统计分析发现, 在第 12 小时, 初始 pH 为 6.0 和 6.5 两组菌液 A_{600} 值与其他各

组相比差异显著($P < 0.05$); 且在第 24 小时, 初始 pH 为 7.0 及 7.5 的两组菌液 A_{600} 值与其他各组有显著性差异($P < 0.05$)(图 5)。通过统计分析结果可知, pH7.0~8.0 是杀鲑气单胞菌生长较适宜的范围。

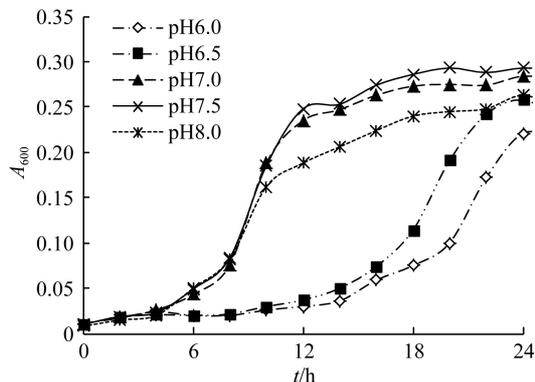


图4 不同 pH 条件下杀鲑气单胞菌生长曲线

Fig. 4 Growth curves of *Aeromonas salmonicida* under different pH

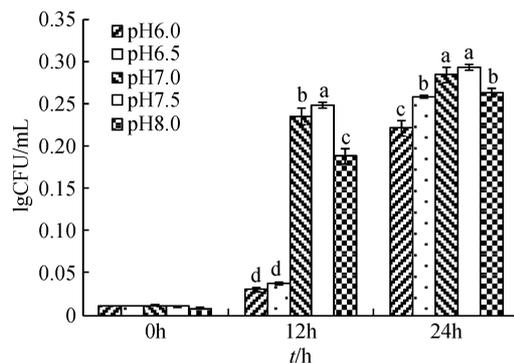


图5 杀鲑气单胞菌在不同 pH 条件下培养 12h、24h 菌液 A_{600} 值

Fig. 5 A_{600} of *Aeromonas salmonicida* cultivated under different pH for 24 h and 48 h

另外, 实验中发现, 随着杀鲑气单胞菌的生长, 菌液 pH 会发生变化(表 1), 总体呈下降趋势。实验前后 pH 变化范围为 0.101~0.207, pH 下降说明杀鲑气单胞菌在生长过程中会产生酸性代谢产物。

3 讨论

3.1 不同温度对杀鲑气单胞菌生长的影响

从本实验研究结果可以看出, 杀鲑气单胞菌适宜生长温度为 28°C, 这与 Statner B 等^[8]的研究结果一致。在实际生产当中, 杀鲑气单胞菌主要感染对象为鲑科鱼类, 而鲑鱼属于冷水性鱼类, 其最适生长水温一般为 12~18°C, 根据品种不同而有所差别, 陆

表 1 实验过程中菌液 pH 的变化

Tab.1 Bacterium liquid pH changes during the experimental process

时间(h)	pH				
	1	2	3	4	5
0	6.027 ± 0.015	6.516 ± 0.017	7.022 ± 0.035	7.509 ± 0.070	8.034 ± 0.055
6	6.019 ± 0.071	6.481 ± 0.012	6.924 ± 0.042	7.481 ± 0.004	7.986 ± 0.011
12	5.983 ± 0.007	6.467 ± 0.007	6.884 ± 0.015	7.302 ± 0.014	7.823 ± 0.016
18	5.926 ± 0.013	6.403 ± 0.009	6.832 ± 0.007	7.291 ± 0.012	7.871 ± 0.006
24	5.883 ± 0.016	6.384 ± 0.005	6.733 ± 0.006	7.289 ± 0.012	7.728 ± 0.004

封型大西洋鲑(*Atlantic Salmon*)最佳生长温度为 12~16℃^[9], 高白鲑(*Coregonus Peled*)为 12~16℃^[10], 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)为 12~18℃^[11], 因此在工厂化养殖过程中, 为抑制杀鲑气单胞菌在系统中的生长繁殖, 可将水温调节为适宜鱼类生长的最低温度, 从而降低养殖过程中杀鲑气单胞菌大量繁殖导致鱼类疾病暴发的风险。但在低温条件下, 细菌生长速率的降低主要是由于酶活性降低, 酶促过程减缓, 而不是由于蛋白质变性或细胞死亡^[12]引起的。因此, 降低温度只能起到抑制作用, 而不能彻底消灭杀鲑气单胞菌的危害。在实际生产当中, 降低养殖水体温度也只能作为一种减少病害的预防手段, 为降低杀鲑气单胞菌对养殖鱼类的威胁还需与其他检测及防治手段相结合。

3.2 A 值法与平板计数法的比较

用于细菌计数的常规方法有很多, 包括平板计数法、MTT 法、A 值法、血细胞计数板法、浊度法等, 目前为止最为稳定可靠的是平板计数法^[13]。经实验发现, A 值法与平板计数法测得的结果有一定的差别。A 值法不能区分死亡细菌, 其测得的是活菌及死亡细菌总数。在细菌生长的对数期, 死亡细菌很少可忽略不计, 稳定期会有大量细菌死亡, 因而在实验后期测得的 A 值并不能真实的反映细菌的数量, 这与前人关于嗜水气单胞菌生长的研究结果相似^[14]。另外, 因测量仪器量程等的限制, 在测较低或过高浓度病原菌数量变化情况时, 该方法会存在局限性^[15]。从实验操作方面来看, 平板计数法耗时长, 劳动强度大, 无菌操作要求严格, 而 A 值法操作简便快捷, 在一定程度上也可反映细菌数量变化趋势, 因此在细菌生长参数的检测中 A 值法常被广泛应用。针对本实验结果进行分析, 由于该菌在低温条件下生长较慢, 菌液浓度较低, 为保证测量结果的准确性, 建议采用平板计数法进行检测。

3.3 不同 pH 对杀鲑气单胞菌生长的影响

环境 pH 会对细菌的生命活动产生重要影响, pH 的改变会引起细胞膜电荷变化, 进而影响细菌对营养物质的吸收, 影响代谢过程中酶的活性; 改变生长环境中营养物质的可给性以及有害物质的毒性。多数病原菌的最适 pH 为中性或弱碱性(pH7.0~7.6), 部分病原菌最适 pH 为酸性, 如乳本乡杆菌(pH5.5)。个别病原菌在碱性条件下生长良好, 如霍乱弧菌在 pH8.4~9.2 时生长最好。张国军等^[16]报道香港海鸥型菌最适生长 pH 为 5.5~6.0。陈向敏等^[17]报道创伤弧菌在 pH8.0~8.5 的条件下细菌的浓度能达到最高。本实验研究结果表明, 杀鲑气单胞菌最适 pH 为中性或弱碱性(7.0~8.0)。统计分析结果显示, 在酸性与碱性条件下其生长差异性显著($P < 0.05$), 说明酸性条件能明显抑制其生长。在实际养殖生产中, 杀鲑气单胞菌主要感染鲑鳟鱼类, 不同品种的鲑鳟鱼对养殖水体 pH 要求不同, 如高白鲑(*Coregonus peled*)的 pH6~9^[10]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的 pH6.5~7.5^[11]。因此, 在养殖过程中可根据养殖鱼品种的不同, 合理调控水体 pH, 在保证鱼正常生长条件下, 抑制杀鲑气单胞菌在系统中的生长繁殖, 从而降低鱼类发病率。

4 结论

杀鲑气单胞菌会对大西洋鲑鱼的健康养殖造成威胁。作者以养殖生产系统中分离得到的杀鲑气单胞菌为实验对象, 研究了不同温度及 pH 对杀鲑气单胞菌生长的影响, 并绘制了其在不同条件下的生长曲线。通过本实验研究得到以下结论。

- (1) 在本实验条件下, 杀鲑气单胞菌生长速率随温度降低逐渐下降;
- (2) 在 pH6.0~8.0 时, 酸性条件下能明显抑制杀鲑气单胞菌的生长;
- (3) 28℃、pH7.5 为杀鲑气单胞菌生长的最佳条

件,在此条件下杀鲑气单胞菌生长速率最快,达到稳定期时细菌数量也最多。

(4) 建议在不影响鱼类正常生长的条件下,尽量降低养殖水体温度并合理控制水体 pH,对抑制鱼类养殖过程中杀鲑气单胞菌的生长繁殖,降低养殖鱼类发病率具有一定的理论指导意义。

近几年,一些地区将鲑鳟鱼类养殖作为特色产业和重要渔业经济支持其发展^[18],工厂化养殖规模也逐步扩大,环境条件可控性逐步增强。但随之也出现了一系列的病害问题,其中杀鲑气单胞菌的危害十分严重,死亡率高达 70%以上^[19]。因此,在鲑鳟鱼实际养殖过程中,可以根据杀鲑气单胞菌生长特点,合理控制养殖水体温度或 pH,抑制杀鲑气单胞菌的生长繁殖,从而减少养殖鱼类感染该致病菌的可能性,降低发病率。

为促进鲑鳟鱼类的健康养殖,针对其主要病原菌杀鲑气单胞菌的研究需继续深入开展。在将来的工作中,可选择其他环境因子,包括 C/N 比、盐度等作为影响因素进一步探讨杀鲑气单胞菌的生长特点,深入研究其生物学特性,建立其在不同条件下的生长动力学模型,为合理预测杀鲑气单胞菌在鱼类养殖水体中的生长动态变化,建立病害预警机制提供理论依据。

参考文献:

[1] Dallaire D, Katherine H T, Mélanie V T, et al. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(1): 1-7.

[2] Germán A C, Roberto B, Ana P L, et al. Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies[J]. *Aquaculture*, 2014, 430: 79-85.

[3] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 石鲈(*Kareius bicoloratus* L.) 源杀鲑气单胞菌杀鲈亚种生物学性状的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 36(1): 51-60.

[4] 杨嘉龙, 周丽, 邢婧, 等. 养殖刺参溃疡病杀鲑气单胞菌的分离、致病性及胞外产物特性分析[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 981-989.

[5] 曹成易, 汪开毓, 王玲, 等. 大西洋鲑杀鲑气单胞菌的分离鉴定[J]. *淡水渔业*, 2009, 39(1): 54-57.

[6] Michael E Rh, Singh R K, Curtis B, et al. The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 427.

[7] Chhabra S, Durant E, Fish L, et al. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 177: 5271-5281.

[8] Statner B, Jones M J, George W L. Effect of incubation temperature on growth and soluble protein profiles of motile *Aeromonas* strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1988, 26(2): 392-393.

[9] 陆九韶, 李永发, 夏重志, 等. 人工养殖陆封型大西洋鲑的生物学特性[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 78-80.

[10] 刘宏斌, 王位莹, 李胜忠. 高白鲑稚鱼生长特性的研究[J]. *新疆农垦科技*, 2013, 10: 21-22.

[11] 马志坚, 朱国强. 虹鳟生物学特性及养殖技术[J]. *黑龙江水产*, 2009, 132(4): 23-27.

[12] Natasja C, van Gestel, Stephanie R, et al. Temperature sensitivity of bacterial growth in a hot desert soil with large temperature fluctuations[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2013, 65: 180-185.

[13] 刘宝生, 余占桥. 一株高度黏连的枯草芽孢杆菌的活菌计数[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2011, 19: 19-21.

[14] 杨国钊, 叶红, 容庭, 等. 嗜水气单胞菌生长曲线的测定及药物敏感性试验[J]. *试验研究*, 2011, 9: 27-29.

[15] Dalgaard P, Koutsoumanis K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 43(3): 183-196.

[16] 张国军, 吴淑勤, 潘厚军, 等. 温度和 pH 对香港海鸥型菌 GRA1 株生长的影响[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(7): 657-660.

[17] 陈向敏, 董海燕, 林巧爱, 等. 创伤弧菌优化培养条件的研究[J]. *温州医学院学报*, 2003, 33(2): 92-93.

[18] 孙大江, 王炳谦. 鲑科鱼类及其养殖状况[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(2): 56-60.

[19] 童寰亮, 王作芸, 周建玲, 等. 杀鲑气单胞菌的快速检测[J]. *动物检疫*, 1993, 10(5): 7-8.

Effect of temperature and pH on the growth of *Aeromonas salmonicida*

TIAN Hui-qin¹, LI Xian², FU Song-zhe³, REN Xiang², WANG Shun-kui⁴,
WANG Xian-ping⁴, SONG Xie-fa¹, LIU Ying²

(1.Ocean University of China, Qingdao 266100, China; 2.Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 3. City Disease Prevention and Control center of Nanchang, Nanchang 330038, China; 4. Shandong Oriental Ocean Technology Co., Ltd., Yantai 264003, China)

Received: Dec., 21, 2014

Key words: *Aeromonas salmonicida*; temperature; pH; growth

Abstract: In this paper, the effects of different temperatures and pH on the growth of *Aeromonas salmonicida* were studied. The results showed that plate count method could better reflect the true dynamic growth condition of *A. salmonicida*. At the four temperature gradients (28, 15, 10 and 5°C), as the temperature decreased, the growth rate of *A. salmonicida* decreased obviously. Within the range of pH 6.0~8.0, *A. salmonicida* could grow, but its growth was significantly inhibited under acid conditions. The results also showed that *A. salmonicida* had gained the highest growth rate and the largest amount under the condition of 28 °C and pH 7.5. This study has a certain theoretical guiding significance to the actual production. In order to inhibit the growth of *A. salmonicida* and reduce the infection of the farmed fish, it is strongly suggested to reduce the temperature and control the pH value in aquaculture reasonably.

(本文编辑: 梁德海)