

鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) M3 菌株生长条件 及其对蛋白酶产量的影响*

陈师勇 张培军^{†1)} 莫照兰[†] 邹玉霞[†] 张振冬[†] 徐永立[†]

(中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071;

中国科学院研究生院 北京 100039)

[†](中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室 青岛 266071)

摘要 采用体外测定细菌浓度、胞外产物(ECP)蛋白含量和蛋白酶活力的方法,进行了鳗弧菌 M3 菌株在 2216E 培养基中的培养条件研究。结果表明,该菌株用固体培养基培养至 24h 左右,可得到较高的菌体浓度、ECP 蛋白含量和蛋白酶活力。采用响应面分析方法设计实验,用 SAS 统计软件分析数据,得到 NaCl 浓度、pH 值和温度对菌体生长及蛋白酶产量影响的回归模型。在 2216E 培养基的基础上,添加不同氮源、碳源物质以及不同浓度蛋白胨进行生长研究。结果表明,胰大豆蛋白胨能促进菌体生长及 ECP 蛋白分泌;NH₄Cl 与酪蛋白水解物可抑制蛋白酶的产生;牙鲆肌肉匀浆对菌体、ECP 蛋白产量和蛋白酶产生有不同程度的促进作用;培养基中蛋白胨浓度为 4% 时菌体量与 ECP 蛋白含量达最高值,在蛋白胨浓度为 2% 时蛋白酶分泌量已稳定;1% 的葡萄糖、蔗糖、甘油均能显著地提高菌体及 ECP 蛋白产量,却抑制了蛋白酶的产生。

关键词 鳗弧菌,蛋白酶,响应面分析,胞外产物,生长

中图分类号 S936

鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是引起水产养殖动物流行性疾病的一种重要病原,曾在世界范围内引起养殖鱼类的流行病爆发 (Lightner, 1977; Mahnken, 1975)。牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 是一种重要海水经济鱼类,在中国北方沿海地区已形成较大的工厂化养殖规模,近年来在其遗传、生态等方面已有较多报道 (尤锋等, 1999; 徐成等, 2002)。但由于其养殖规模的逐年扩大和养殖密度的提高,出现了多种疾病,其中以细菌病最为重要,导致严重的经济损失 (莫照兰等, 2001, 2003)。至今,人们已发现了多种鳗弧菌毒力因子,如:铁获取系统 (Actis *et al.*, 1988)、外膜蛋白 (Mazoy *et al.*, 1996)、脂多糖 (Austin *et al.*, 1995)、蛋白酶 (Norqvist *et al.*, 1990)、鞭毛 (Milton *et al.*, 1996)、溶血素 (Hirono *et al.*, 1996) 等。在山东荣成寻山养鱼场,作者从濒临死亡的患病牙鲆中

分离出一株鳗弧菌强毒性株,命名为 M3 (Mo *et al.*, 2001),发现其胞外产物 (ECP) 具有强致病性 (Mo *et al.*, 2002),并从中分离纯化到一种毒性极强的金属蛋白酶 (陈师勇等, 2002)。为进一步了解鳗弧菌 M3 致病机制、研制疫苗,以及研究此金属蛋白酶在鳗弧菌 M3 致病过程中所起的作用,首先需要大量培养菌体以及从 ECP 中分离金属蛋白酶。为此,作者对鳗弧菌 M3 的生长条件及其胞外产物中金属蛋白酶产生条件进行了研究。鉴于酶活力的高低在一定程度上反映出金属蛋白酶含量的变化,作者通过测定 ECP 中总酶活力来判断金属蛋白酶产生的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 菌体培养及胞外产物的获得

鳗弧菌 M3 接种于 2216E 液体培养基, 28℃ 摇床

* 国家“973”重点基础研究专项经费资助项目, (G1999012003) 号; 国家高技术研究发展计划 (863) 课题资助项目, (2001AA620207) 号。陈师勇, 博士, E-mail: dragonchensy@yahoo.com.cn

1) 通讯作者, 张培军, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2002-10-30, 收修改稿日期: 2003-05-30

培养过夜。将菌体涂布于预先放置了一层玻璃纸的 2216E 平板上, 28℃ 培养 24h 后用 0.02mol/L、pH = 7.4 的磷酸缓冲液 (PBS) 洗下菌体, 4℃、8000g 离心除去菌体, 上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤进一步去除残余菌体, 即得胞外产物 ECP。

1.2 菌体浓度、胞外产物蛋白含量及蛋白酶活力的测定

菌体浓度稀释 30 倍后, 以 600nm 吸光值表示。

蛋白含量以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, ECP 稀释 5 倍后采用 Folin-酚法测定蛋白含量, 以 500nm 吸光值表示。

蛋白酶活力测定参照 Shao 等 (2000) 方法略加修改, 以 440nm 吸光值表示。简述如下: 依次加入 0.025ml 酶样品、10mmol/L pH8.0 Tris-HCl 缓冲液 0.05ml 与 5mg/ml 蛋白酶底物 azocasein (Sigma) 0.1ml, 经 28℃ 反应 0.5h 后, 加 0.7ml 三氯乙酸终止反应。离心取上清液 0.5ml, 加入等体积 0.5mol/L NaOH, 在 440nm 波长下测光吸收值。

1.3 培养方法与试验组设置

在使用 2216E 培养基进行培养的情况下, 进行以下几项检测:

1) 以 NaCl 浓度、pH 值、温度为自变量, 菌体生长浓度及蛋白酶活力为响应值, 设置三因素五水平响应面实验, 共选 20 个试验点, 检测上述三个因子对菌体生长及蛋白酶产生的影响。

2) 在培养基中添加不同氮源成分: 1% 脑心浸液、1% 蛋白胨、3% 蛋白胨、1% 胰大豆蛋白胨 (TSB)、1% 蛋白胨 + 50mmol/L NH₄Cl、1% 蛋白胨 + 1% 酪蛋白水解物、1% 蛋白胨 + 4% 牙鲆肌肉匀浆等。以 1% 蛋白胨培养基的菌体含量、ECP 含量和蛋白酶活力为 100% 进行比较分析这些添加成分对菌体生长及蛋白酶所产生的影响。

3) 检测培养基中不同蛋白胨浓度 (0.5%、1%、2%、4%、6%) 对菌体生长及蛋白酶活力的影响。

4) 检测培养基中添加 1% 不同的碳源物质 (葡萄糖、蔗糖、甘油) 时对菌体生长及蛋白酶活力的影

响, 以 1% 蛋白胨培养基的菌体含量、ECP 含量、蛋白酶活力为 100% 进行比较测定。

2 结果

2.1 对在 2216E 培养基中生长的鳗弧菌 M3 及其胞外产物中金属蛋白酶活力的检测

对在 2216E 固体培养基上和液体培养基中生长的不同时期鳗弧菌 M3 进行浓度测定, 绘制了 0—36h 的菌体生长曲线, 同步检测了 M3 分泌的胞外蛋白含量 (固体培养基) 及其中所含蛋白酶的活力 (固、液体培养基)。结果表明, M3 在液体培养基中培养 1—5h 处于对数生长期, 5—18h 生长速度逐渐下降, 18h 后进入静止期 (平台期)。蛋白酶活性直到对数生长后期才检测到, 随后逐渐升高, 并在细菌生长稳定期达到最大分泌量, 约 28h 后缓慢下降。M3 在固体培养基中 12h 前为对数生长期, 12h 后进入静止期。从培养 2h 起便可检测到 ECP 蛋白的产生, 但在 4h 之前蛋白酶的活力几乎为 0。随着菌体的生长, ECP 蛋白含量持续增加, 蛋白酶活力也逐渐增加, 直到平台期的中后期 (24h), ECP 蛋白含量达到最高, 26h 后呈下降趋势, 而蛋白酶活力则在 22h 达到高峰, 并保持较高活力到 36h。由于采用固体培养基产生的胞外产物总体积小, ECP 浓度及蛋白酶活力高, 减少了液体培养基中杂蛋白的影响, 有利于毒性蛋白酶的进一步纯化, 因此, 在以后的实验中均采用固体培养基进行培养。

2.2 NaCl 浓度、pH 值及温度对 M3 生长及产酶条件影响的响应面分析

2.2.1 实验设计 采用响应面分析方法 (Response Surface Methodology), 根据 Box-Wilson 中心组合设计原理设计了以 NaCl 浓度、pH 值、温度为自变量, 以菌体生长浓度及金属蛋白酶活力为响应值的三因素五水平实验。共安排了 20 组实验, 其中 14 组为析因子实验, 6 组为零点 (表 1)。实验以随机次序进行, 重复 3 次, 获得的菌体生长浓度和蛋白酶活力的平均值用 SAS 统计分析软件 RSREG (Response Surface Regression) 程序进行分析, 并得到方差分析表。

表 1 响应面分析实验结果

Tab.1 The results of Response Surface experiment

编号	X_1	X_2	X_3	菌体生长浓度(OD_{600})	蛋白酶活力(OD_{440})
1	-1	-1	-1	0.192	0.126
2	-1	-1	1	0.175	0.125
3	-1	1	-1	0.186	0.150
4	1	-1	-1	0.070	0.031
5	1	1	-1	0.048	0.048
6	1	-1	1	0.134	0.089
7	-1	1	1	0.177	0.131
8	1	1	1	0.106	0.038
9	-1.682	0	0	0.202	0.126
10	1.682	0	0	0.052	0.034
11	0	-1.682	0	0.186	0.127
12	0	1.682	0	0.175	0.110
13	0	0	-1.682	0.115	0.078
14	0	0	1.682	0.156	0.088
15	0	0	0	0.197	0.135
16	0	0	0	0.162	0.126
17	0	0	0	0.186	0.169
18	0	0	0	0.196	0.150
19	0	0	0	0.166	0.124
20	0	0	0	0.187	0.130

2.2.2 实验分析 根据实验设计进行了20组实验,得到数据结果见表1。回归模型采用方程:

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + a_3 X_3 + a_{11} X_1^2 + a_{22} X_2^2 + a_{33} X_3^2 + a_{12} X_1 X_2 + a_{13} X_1 X_3 + a_{23} X_2 X_3$$

根据实验数据用 SAS RSREG 程序计算出方程中各项系数(表2),并进一步对回归模型进行方差分析,结果见表3。数据分析发现,两回归模型的复相关系数平方 R^2 分别达到 0.9674 及 0.9227,并且失拟项均不显著($P \gg 0.05$)。因此完全可以用回归模型来对实验结果进行分析和预测。同时,可以看出菌体生长浓度方程、蛋白酶活力方程的一次项、二

次项对方程响应值的影响均达极显著水平,说明各个具体试验因子对响应值影响不仅仅是简单的线性关系;菌体生长浓度方程的交互项 P 值 < 0.01 ,达到极显著水平,说明各因子之间相互影响不容忽视。从各因素及与它有关的所有交互作用项的联合检验结果可以看出,在菌体生长及蛋白酶产生的过程中 X_1 (NaCl 浓度)和 X_3 (温度)的影响极为显著($P < 0.01$),而 X_2 (pH 值)在实验范围内(5.9—9.3)对响应值的作用较弱。对模型的典型分析,得到了回归模型的最优值及其最优条件(表4)。

表 2 回归系数取值

Tab.2 The values of regression coefficient

系数	菌体浓度方程取值	蛋白酶活力方程取值	系数	菌体浓度方程取值	蛋白酶活力方程取值
a_0	-0.2303	-1.0016	a_{22}	-0.0077	-0.0106
a_1	0.0106	0.0976	a_{33}	-0.0027	-0.0070
a_2	0.0467	0.1640	a_{12}	0.0041	0.0018
a_3	0.0214	0.0385	a_{13}	2.9E-5	-0.0018
a_{11}	-0.0384	-0.03667	a_{23}	-5.2E-4	-5.4E-4

表 3 回归模型方差分析及各因素及其交互作用项联合检验结果

Tab.3 Error analysis of regression models and Co-analysis of factors and their interactions

方差来源	自由度	菌体浓度			蛋白酶活力		
		均方差	方程 F 值	P 值	均方差	方程 F 值	P 值
一次项	3	0.0103	68.526	0.0000	0.005695	22.803	0.0001
二次项	3	0.003563	23.775	0.0001	0.003585	14.356	0.0006
交互项	3	0.0010	6.694	0.0093	6.59E-4	2.640	0.1069
失拟项	5	7.6E-5	0.341	0.8685	1.97E-4	0.652	0.6750
模型总体	9	0.00494	32.998	0.0000	0.00331	13.266	0.0002
误差	5	2.23E-4			3.02E-4		
复相关系数 R^2		0.9674			0.9227		
X_1	4	0.009556	63.762	0.0000	0.006013	24.078	0.0000
X_2	4	0.000188	1.253	0.3503	0.000549	2.200	0.1423
X_3	4	0.002420	16.151	0.0002	0.001783	7.138	0.0055

表 4 回归模型的典型分析

Tab.4 Typical analysis of regression models

响应值变量	NaCl (%)	pH	温度 (°C)	计算最优值	点类型
菌体生长浓度方程	0.58	7.94	23.3	0.208	最大值
蛋白酶活力方程	0.71	8.29	23.04	0.156	最大值

2.3 培养基中不同氮源对菌体生长及蛋白酶产量的影响

表 5 显示了不同氮源对菌体生长及蛋白酶产量的影响。由表 5 可以看出,添加 1% 脑心浸液与 1% 蛋白胨相比,培养出的菌体量与 ECP 蛋白量相近,而酶活则略低;胰大豆蛋白胨(TSB)与蛋白胨相比酶活力相差无几,而产生的菌体量与 ECP 蛋白量却高于蛋白胨,这一

点在高浓度蛋白(3%)的培养基中更加明显。实验同时发现,1% 蛋白胨培养基加入 NH_4Cl 后,菌体量与 ECP 蛋白量变化不大,蛋白酶活力却下降了 49.3%;1% 蛋白胨培养基加入酪蛋白水解物后,菌体量与 ECP 蛋白量增长近 1 倍,而蛋白酶活力却有明显下降;在 1% 蛋白胨培养基加入牙鲜肉匀浆后,菌体量、ECP 活力和蛋白酶活力有了不同程度的增长。

表 5 不同氮源对菌体生长、ECP 及蛋白酶产生的影响

Tab.5 Effect of different nitrogen sources on growth, ECP and protease production

氮源	菌体生长(%)	ECP 蛋白产生(%)	蛋白酶活力(%)
1% 蛋白胨(对照)	100	100	100
3% 蛋白胨	146.7	152.0	126.4
1% 脑心浸液	108.9	103.2	77.4
1% TSB	126.5	126.7	96.7
3% TSB	257.0	242.2	125.6
1% 蛋白胨 + NH ₄ Cl	95.4	90.5	49.3
1% 蛋白胨 + 酪蛋白水解物	208.3	177.4	66.2
1% 蛋白胨 + 牙鲆肉匀浆	132.0	118.6	116.5

步提高蛋白胨浓度,则蛋白酶产量也稍下降。

2.4 不同蛋白胨浓度对菌体生长及蛋白酶产量的影响

培养基中加入不同浓度蛋白胨进行培养后,结果发现收获菌体量与 ECP 蛋白量变化趋势类似。初始随着培养基中蛋白胨浓度的提高,菌体浓度和 ECP 蛋白含量均升高;蛋白胨浓度为 4% 时达最高值;进一步提高蛋白胨浓度,收获量反而稍下降。在培养基中蛋白胨浓度升至 2% 时蛋白酶产量已达稳定;蛋白胨浓度继续升至 4% 时,蛋白酶产量变化不大;进一

2.5 不同碳源物质对菌体生长及蛋白酶产量的影响

表 6 显示了在 2216E 海水培养基添加了 1% 碳源物质培养的结果。由表 6 可以发现,培养基添加了葡萄糖、蔗糖及甘油均能显著促进菌体及 ECP 蛋白产量的提高,其中以蔗糖为最高,葡萄糖与甘油次之。但是三种培养基培养的蛋白酶活力均明显下降,下降水平大致一样。

表 6 添加不同碳源物质对菌体生长及蛋白酶产量的影响

Tab.6 Effect of different carbohydrate sources on growth, ECP and protease production

碳源	菌体生长(%)	ECP 蛋白产量(%)	蛋白酶活力(%)	碳源	菌体生长(%)	ECP 蛋白产量(%)	蛋白酶活力(%)
无	100	100	100	蔗糖	314	185	67
葡萄糖	275	171	70	甘油	206	156	71

3 讨论与结论

鳃弧菌 M3 的金属蛋白酶在 ECP 蛋白中含量很高(陈师勇等,2002),但在液体培养基中培养时,至对数生长中后期才能检测到蛋白酶活力,这也是许多细菌培养时的常见现象,如 *Yersinia ruckeri* (Secades *et al.*, 1999)、*V. alginolyticus* (Long *et al.*, 1981)、*V. cholerae* (Young *et al.*, 1982) 等。Croxatto 等(2002)的研究表明,鳃弧菌金属蛋白酶的分泌受密度调控基因的控制,只有当菌体浓度达到一定范围时,鳃弧菌才开始分泌蛋白酶。本实验结果证实了这一点。在固体培养基上,由于菌体接种时相对浓度较高,因此在对数生长较早时期已有蛋白酶的分泌。当细菌培养至 24h 左右进行收获,可得到较

高的菌体浓度及胞外蛋白含量,此时的蛋白酶酶活也最高。

鳃弧菌的生长适应性很强,在 NaCl 浓度为 0.15%—10%, pH 为 4.5—10, 温度为 1—42℃ 间的广范围条件下都能生长。作者综合考虑了 NaCl 浓度、温度和 pH 值三个因素对菌体生长和产酶的影响,采用响应面分析方法,根据 Box-Wilson 中心组合设计原理设计了三因素五水平实验,用 SAS 统计分析软件处理实验数据,得到了菌体生长和产酶模型,以及取得模型最优值时各因素的水平。实验结果表明,菌体生长及蛋白酶产生的过程中 NaCl 浓度和温度的影响极为显著,而 pH 值的影响较弱。菌体生长模型的交互项达到极显著水平,说明各因素之间

交互作用明显。Veronlque 等(1995)在研究鳗弧菌及鳗弧菌相关菌株生长条件时,也发现了培养时最佳 NaCl 浓度和生长温度之间相互影响的现象,与作者的分析结果相似。

培养基中不同氮源对菌体生长及蛋白酶产量影响的分析表明,脑心浸液比蛋白胨产酶略低,TSB 与蛋白胨相比酶活力相差无几,而菌体产量和 ECP 蛋白量明显增高。这一点在高浓度(3%)蛋白培养基中更明显。因此,从经济角度考虑,以提取金属蛋白酶为培养目的时,采用蛋白胨培养基,而以收集菌体为目的时可采用 TSB 培养基。实验发现,培养的菌体量与 ECP 蛋白量随培养基中蛋白胨浓度的提高而升高,蛋白胨浓度达 4% 时达最高值,蛋白酶分泌量在培养基的蛋白浓度为 2% 时已经稳定,蛋白浓度升至 4% 时,ECP 中蛋白酶含量并不增长,进一步提高蛋白浓度反而抑制了蛋白酶产生。因此,要收获蛋白酶,培养基蛋白浓度采用 2% 即可;若以培养菌体及收集 ECP 蛋白为主要目的,培养基蛋白浓度采用 4%。

在蛋白胨培养基中添加 50mmol/L NH_4Cl 只检测到 49% 的蛋白酶活力,说明 NH_4^+ 的存在能抑制蛋白酶的产生。同样的现象也在 *A. hydrophila* (O'Reilly *et al*, 1983)、*Vibrio strain SA1* (Wiersma *et al*, 1978) 中发现。在蛋白胨培养基中添加酪蛋白水解物,菌体与 ECP 蛋白产量均大大提高,而蛋白酶产量却明显下降。Secades 等(1999)发现,*Y. ruckeri* 在培养基中只有酪蛋白水解氨基酸为氮源的情况下,没有能检测到蛋白酶活性,并且在 *A. salmonicida* (Dalhe, 1971)、*Vibrio sp.* (Dreisbach *et al*, 1978) 中也观察到了类似现象,都说明诱导蛋白酶的产生需要完整的肽结构。培养基中添加碳水化合物无一例外地促进了菌体生长及胞外产物分泌,但却抑制了蛋白酶分泌,说明蛋白酶的产生受分解代谢物阻遏调控。类似的机制在 *V. alginolyticus* (Long *et al*, 1981)、*Pseudomonas maltophilia* (Boethling, 1975) 及 *Staphylococcus aureus* (Yoshikawa *et al*, 1974) 也被充分阐述。酪蛋白水解物与糖类对蛋白酶产生的抑制,说明菌体在具有充足的能量物质时会减少蛋白酶的产生。在缺乏糖为碳源情况下,蛋白酶在为寄主提供小肽、氨基酸等作为氮源、碳源等能量物质等方面起较大作用。因此,作者看到在蛋白胨培养基中添加 4% 的牙鲆肌肉匀浆,发现菌体量和蛋白酶分泌量有了不同程度的提高。

尽管目前还没有蛋白酶参与宿主发病机理的直

接证据,但是一些重要的鱼类病原菌如:*A. salmonicida* (Gunnlaugsdottir *et al*, 1997)、*V. vulnificus* (Kothary *et al*, 1985) 和 *A. hydrophila* (Leung *et al*, 1988) 等的蛋白酶在导致宿主组织损伤、协助建立病原感染等方面起重要作用。本实验室从 M3 菌株 ECP 中分离到的金属蛋白酶毒性也极强(陈师勇等, 2002),其对金鱼的半数致死量 LD_{50} 达到 1.2 μg 蛋白/g 体重。本研究结果表明金属蛋白酶在鳗弧菌 M3 生长中提供营养方面起到一定作用,而关于金属蛋白酶在鳗弧菌 M3 侵染宿主引发病症过程中的作用机理则有待进一步研究。

参 考 文 献

- 尤 锋,王可玲,相建海等,1999. 山东近海同工酶的生化分析. 海洋与湖沼,30(1): 127—133
- 陈师勇,莫照兰,张振冬等,2002. 鳗弧菌胞外产物中致病因子的分离纯化及性质研究. 高技术通讯,12(8): 96—101
- 莫照兰,茅云翔,陈师勇等,2001. 一株牙鲆出血症病原菌的分子生物学鉴定. 高技术通讯,11(12): 12—17
- 莫照兰,茅云翔,陈师勇等,2003. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析,海洋与湖沼,34(2): 131—141
- 徐成,王可玲,徐永立等,2002. 雌核发育牙鲆同工酶基因的重组及父方基因的表达. 海洋与湖沼,33(6): 62—67
- Actis L A, Tolmasky M E, Farrell D H *et al*, 1988. Genetic and molecular characterization of essential components of the *Vibrio anguillarum* plasmid-mediated iron-transport system. J Biol Chem, 263: 2853—2860
- Austin B, Alsina M, Austin D A *et al*, 1995. Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. Syst Appl Microbiol, 18: 285—302
- Boethling R S, 1975. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. J Bacteriol, 123: 954—961
- Croxatto A, Chalker V J, Lauritz J, 2002. VanT, a homologue of *Vibrio harveyi* LuxR, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. J Bacteriol, 184(6): 1617—1629
- Dalhe H K, 1971. Regulation of the proteinase production in two strains of *Aeromonas*. Acta Pathol Microbiol Scand Sect B, 79: 739—746
- Dreisbach J H, Merkel J R, 1978. Induction of collagenase production in *Vibrio B-30*. J Bacteriol, 135: 521—527
- Gunnlaugsdottir B, Gudmundsdottir B K, 1997. Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. J Appl Microbiol, 83: 541—543
- Hirono I, Masuda T, Aoki T, 1996. Cloning and detection of the

- hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microb Pathog*, 21(3): 173—182
- Kothary M H, Kreger A S, 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun*, 50: 534—540
- Leung K Y, Stevenson R M W, 1988. Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect Immun*, 56: 2639—2644
- Lightner D V, 1977. *Vibrio* Disease of Shrimps. In: Sindermann C J ed. *Disease Diagnosis and Control in North American*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, 19—26
- Long S, Mothibeli M A, Robb F T *et al*, 1981. Regulation of extracellular alkaline activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *J Gen Microbiol*, 127: 193—199
- Mahnken C V W, 1975. Status report on commercial salmon culture in Puget Sound. *Commercial Fish Farmer Aquaculture News*, 2: 8—11
- Mazoy R, Lemos M L, 1996. Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiol Lett*, 135(2—3): 265—270
- Milton D L, O'Toole R, Horstedt P *et al*, 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *J Bacteriol*, 178(5): 1310—1319
- Mo Zhaolan, Chen Shiyong, Zhang Peijun, 2002. Properties of proteolytic toxin of *Vibrio anguillarum* from diseased flounder. *Chin J Oceanol Limnol*, 20(4): 316—322
- Mo Zhaolan, Tan Xungang, Xu Yongli *et al*, 2001. A *Vibrio anguillarum* strain associated with ulcerative skin in cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Chin J Oceanol Limnol*, 19(4): 319—326
- Norqvist A, Norman B, Wolf-Watz H, 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun*, 58: 3731—3736
- O'Reilly T, Day F, 1983. Effects of culture conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl Environ Microbiol*, 45: 1132—1135
- Secades P, Guijarro J A, 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl Environ Microbiol*, 65: 3969—3975
- Shao Chung-Ping, Lien-I Hor, 2000. Metalloprotease is not essential for *Vibrio vulnificus* virulence in mice. *Infect Immun*, 68(6): 3569—3573
- Wiersma M, Hansen T A, Harder W, 1978. Effect of environmental conditions on the production of two extracellular proteolytic enzymes by *Vibrio* SA1. *Antonie Leeuwenhoek J Microbiol Serol*, 44: 129—140
- Veronlque G F, Rosso L, Vigneulle M *et al*, 1995. The effect of incubation temperature and sodium chloride concentration on the growth kinetics of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum*-related organisms. *J Appl Bacteriol*, 78: 621—629
- Yoshikawa M, Matsuda F, Naka M *et al*, 1974. Pleiotropic alterations of activities of several toxins and enzymes in mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 119: 117—122
- Young D B, Broadbent D A, 1982. Biochemical characterization of extracellular proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 37: 875—883

THE IMPACT OF CULTURE CONDITIONS ON *VIBRIO ANGUILLARUM* STRAIN M3 GROWTH AND PROTEASE PRODUCTION

CHEN Shi-Yong, ZHANG Pei-Jun[†], MO Zhao-Lan[†], ZOU Yu-Xia[†], ZHANG Zhen-Dong[†], XU Yong-Li[†]

(*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;*

Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

[†](*Experimental Marine Biology Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)*

Abstract Bacteria *Vibrio anguillarum* strain M3, its concentration, extracellular products (ECP) and protease activity were analyzed on solid and liquid 2216E media. Our study showed that during a 24-hour period, higher values are found for the concentration of bacteria, extracellular product and protease activity on the solid media than on the liquid media.

An experiment was designed with Response Surface Methodology to assess the effects of NaCl concentration, pH value and temperature on the growth of bacteria and its protease production. Two regression models were established with SAS statistical software to evaluate the data. Typical analysis of the regression models predicted that the maximal bacteria growth was achieved in the conditions of 0.58% NaCl, pH 7.94 and 23.3°C. Maximum protease production was achieved in the conditions of 0.71% NaCl, pH 8.29 and 23.04°C. In addition, bacteria growth was studied by adding different concentrations of nitrogen, carbon and peptone into 2216E media. It was found that protease activity was lower in the brain heart infusion media than in the peptone media. Compared with the peptone media, bacteria growth and ECP production were stimulated on the trypticase soy agar media, but protease production on both media showed the same level. The presence of Casamino Acids can stimulate bacterial growth and ECP production jointly with NH₄Cl. However, both NH₄Cl and Casamino Acids in the media could significantly decrease the production of bacteria proteases. Muscle homogenate of flounder *Paralichthys olivaceus* was able to enhance the bacteria growth, ECP and protease production on different levels. Concentration of bacteria and ECP reached a maximal value at 4% peptone level in the 2216E medium, but all dropped when the peptone concentration in the medium was higher. Protease production was at a maximum value at 2% peptone level in medium, remaining stable when the concentration of peptone rose to 4%, then dropping with further rises of peptone concentration. Bacteria growth and ECP production increased in the presence of 1% glucose, sucrose or glycerin in the medium, with sucrose giving the highest stimulation effect. However, bacteria protease production decreased dramatically when 1% glucose, sucrose or glycerin was present in the medium. The effect of all three repressors on protease production was on a similar level.

Key words *Vibrio anguillarum*, Protease, Response Surface Methodology, Extracellular products (ECP), Growth