

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0778 - 09

噬菌蛭弧菌颗粒剂制备条件的优化

张小能, 杨先乐, 曹海鹏, 胡 鲲, 安 健, 黄志华

(上海海洋大学国家水生动物病原库, 上海 201306)

摘 要: 试验采用海藻酸钠包埋法对噬菌蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)进行固定化,制备得到噬菌蛭弧菌颗粒。以噬菌蛭弧菌活菌数为考核指标,优化噬菌蛭弧菌固定化条件。通过单因素试验和正交试验,评价了海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)、玉米油浓度、包埋温度、搅拌时间、搅拌速度和交联时间对噬菌蛭弧菌固定化的影响。结果表明,作为载体配方优化因素的海藻酸钠浓度和玉米油浓度对活菌数具有显著性影响,而氯化钙浓度和蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)影响不显著;作为过程优化因素的温度和搅拌速度对活菌数具有显著性影响,而搅拌时间和交联时间影响不显著。在海藻酸钠浓度1.5%、氯化钙浓度6.5%、蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)50%、玉米油浓度4.5%、包埋温度47.5℃、搅拌时间40 min、搅拌速度450 r/min和交联时间36 h的条件下,制得的固定化蛭弧菌颗粒活菌数对数值达到7.51。本方法经济、安全、保存效能好,适合在水产养殖中应用。

关键词: 噬菌蛭弧菌; 颗粒剂; 制备; 优化

中图分类号: S 963.1 文献标识码: A

Optimization of preparation conditions of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules

ZHANG Xiao-neng, YANG Xian-le, CAO Hai-peng, HU Kun, AN Jian, HUANG Zhi-hua

(State Collection Center for Aquatic Pathogen Collection, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Different conditions of *Bdellovibrio bacteriovorus* immobilization were investigated in this study, and the optimal conditions of *Bdellovibrio bacteriovorus* immobilization were confirmed by adopting sodium alginate as embedding medium, survived bacterium number as indices. Single-factor and orthogonal experiments were employed to evaluate the influences of sodium alginate concentration, calcium chloride concentration, the ratio of *Bdellovibrio bacteriovorus* solution to sodium alginate colloidal solution (V/V), corn oil concentration, encapsulating temperature, stirring time, stirring rate and cross-linking time on the immobilization of *Bdellovibrio bacteriovorus*. The results showed that sodium alginate concentration and corn oil concentration had significant influence on survival bacterium number, while calcium chloride concentration and the ratio of *Bdellovibrio bacteriovorus* solution to sodium alginate colloidal solution (V/V) were not in the orthogonal test for optimum carrier formula of immobilization. Furthermore, encapsulating temperature and stirring rate had

收稿日期: 2010-03-20

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(NCYTX-49-17); 鲫鱼细菌性败血症等病害的综合防控技术研究与示范(200803013); 对虾现代产业技术体系研究与建立(nyhyzx07-042)

作者简介: 张小能(1985-),女,硕士研究生,专业方向为水产动物免疫、鱼类药理学与渔药的检测与监控。E-mail: zj1989329@sina.com

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

significant influence on survival bacterium number while stirring time and crosslinking time were not in the orthogonal test for optimum parameters of immobilization. The optimal immobilization conditions were as follows: sodium alginate concentration of 1.5%, calcium chloride concentration of 6.5%, the ratio of *Bdellovibrio bacteriovorus* solution to sodium alginate colloidal solution (V/V) of 50%, corn oil concentration of 4.5%, encapsulating temperature at 47.5 °C, stirring time for 40 min, stirring rate for 450 r/min and crosslinking time for 36 h. Under the above conditions, the logarithm of survival bacterium number of granules was up to 7.51. Therefore, the results demonstrated that the method with the properties of economy, security and good preservation has a promising future in aquaculture.

Key words: *Bdellovibrio bacteriovorus*; granules; preparation; optimization

噬菌蛭弧菌 (*Bdellovibrio bacteriovorus*) (以下简称蛭弧菌) 是一种专门以捕食细菌为生的寄生性细菌^[1]。研究指出,蛭弧菌在净化养殖水体水质、控制或减少水生动物疾病的发生与流行上效果显著^[2-4]。因此,应用蛭弧菌防治水产动物细菌性病害具有良好的发展前景。然而,目前我国商品化的蛭弧菌制剂主要是水剂,还有少量的冻干粉剂。蛭弧菌水剂因保存时间短、质量不稳定以及运输不便等因素而影响了其使用效果,冻干粉剂也因生产成本低而在很大程度上限制了其应用。而微生物固定化法可将游离微生物定位于限定的空间区域,并保持活性,且能反复利用,尤其是包埋固定化法,因操作简单,在制备过程中对微生物活性影响小,制备的颗粒强度较高,更是深受微生态制剂研发人员的青睐^[5-6]。谢冰等^[7]、曹德菊等^[8]和王兰等^[9]分别对硝化细菌、枯草芽孢杆菌和光合细菌进行了固定化研究,证实固定化后菌体活力和抗逆性显著强于游离菌。关于包埋固定化噬菌蛭弧菌的研究,国内外尚未见报道。利用包埋固定化法研制新型蛭弧菌制剂,优化其生产工艺,对推进蛭弧菌制剂的应用效果具有重要的现实意义。本试验采用包埋固定化法制备了蛭弧菌颗粒剂,并结合单因子法和正交试验法对其制备工艺进行了优化,以期对蛭弧菌制剂的大规模生产提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

蛭弧菌 BDF-H16,由本试验室分离于异育银鲫肠道;大肠杆菌 (*Escherichia coli*),为国家水生动物病原库保藏菌株 BYK00105-01-01;普通营养肉汤 (NB) (pH 7.2) 和柠檬酸三钠 (0.055 mol/L) 均在 1×10^5 Pa 高压湿热灭菌 20 min 后备

用;自来水双层琼脂培养基:底层琼脂浓度为 1.5%,上层琼脂浓度为 0.6%。

1.2 蛭弧菌包埋颗粒的制备方法与检测

1.2.1 大肠杆菌菌悬液的制备

参考文献 [10]。

1.2.2 蛭弧菌菌液的制备

以大肠杆菌为增殖宿主菌,采用自来水双层琼脂平板法^[11]将蛭弧菌纯化 10 次,以增强大肠杆菌对蛭弧菌的敏感性,然后挖取单个噬斑,接种于 100 mL 1/10NB 中,同时加入 100 μ L 的大肠杆菌悬液,于 30 °C、150 r/min 下摇床振荡培养 48 h,调节蛭弧菌菌液浓度为 2.0×10^8 PFU/mL,于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.3 蛭弧菌包埋颗粒的制备

取 2% 浓度的海藻酸钠胶体溶液和蛭弧菌菌液 (浓度为 2.0×10^8 PFU/mL),总体积为 100 mL。添加玉米油浓度 1%,于 50 °C 恒温搅拌 20 min 后,快速吸入无菌注射器并以恒定的速度和高度滴入 2% 的 CaCl_2 溶液中固化 24 h,然后收集蛭弧菌固定化颗粒于 -40 °C 条件下冷冻干燥 48 h 后储存检测。

1.2.4 固化颗粒活菌数检测

取 0.1 g 干燥颗粒,加入 10 mL 0.055 mol/L 的柠檬酸钠溶液,待颗粒完全崩解后,混合均匀;经梯度稀释后,采用自来水双层琼脂平板法检测颗粒内蛭弧菌的活菌含量,最后计算每克颗粒内蛭弧菌的活菌数量,本文中以其常用对数值表示^[12]。

1.3 不同因素对颗粒内蛭弧菌活性的影响

分别选取适当梯度的海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例 (V/V)、玉米油浓度、包埋温度、搅拌时间和交联

时间,除海藻酸钠浓度组玉米油浓度为 4% 外,其他条件同 1.2.3 方法制备蛭弧菌包埋颗粒,研究其对固定化蛭弧菌活菌数的影响。

1.4 蛭弧菌包埋颗粒制备的正交试验设计

1.4.1 固定化载体配方优化

参考程树培的方法^[13],在包埋温度、搅拌时间和交联时间分别为 50 ℃、20 min 和 24 h 的条件下,以海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)和玉米油浓

度为影响因素,每个因素选取 4 个水平做正交试验,正交试验的因素水平表见表 1。以活菌数为指标,进行固定化载体配方最优条件的确定。

1.4.2 固定化过程参数优化

为确定海藻酸钙凝胶作为载体材料的最适宜的包埋条件,本试验以单因素及固定化载体配方优化结果为基础,对包埋温度、搅拌时间、搅拌速度和交联时间 4 因素选取 4 个水平进行固定化操作确定最佳的包埋条件,正交试验因素水平见表 2。

表 1 固定化载体配方优化正交试验因素水平表

Tab.1 The factors and levels of orthogonal test for optimum carrier formula of immobilization

水平	因素			
	A 海藻酸钠浓度 (%)	B 氯化钙浓度 (%)	C 蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体 溶液的比例(V/V)(%)	D 玉米油浓度 (%)
1	1.0	5.5	40	4.0
2	1.5	6.0	45	4.5
3	2.0	6.5	50	5.0
4	2.5	7.0	55	5.5

表 2 固定化过程参数优化的因素水平表

Tab.2 The factors and levels of orthogonal test for optimum parameters of immobilization

水平	因素			
	E 包埋温度(℃)	F 搅拌时间(min)	G 搅拌速度(r/min)	H 交联时间(h)
1	42.5	40	350	30
2	45.0	45	400	32
3	47.5	50	450	34
4	50.0	55	500	36

1.5 蛭弧菌颗粒剂的长期稳定性保存试验

将蛭弧菌颗粒剂置于锥形瓶中,以胶塞封口,室温下保存,定期取样检测其活菌数。

1.6 试验数据统计方法

采用统计软件 SPSS 15.0 对试验数据进行方差分析。若差异显著,再进行 Duncan's 多重比较。

2 结果

2.1 固定化颗粒外观形态

采用海藻酸钠为载体包埋制备的蛭弧菌颗粒形态如图 1 所示。颗粒呈白色球状,表面光滑,不透明,不粘连,直径分布为 2~3 mm,且具有

一定的弹性和机械强度。

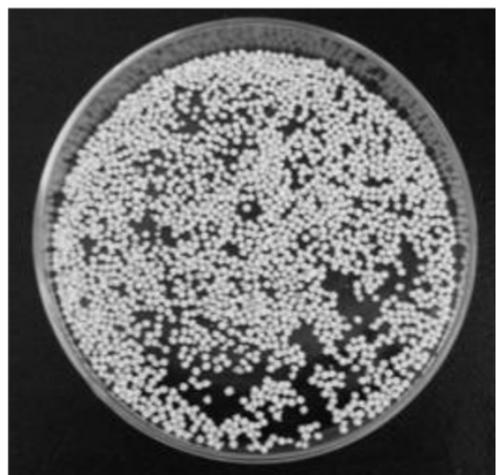


图 1 固定化颗粒形态

Fig.1 Morphology of Immobilization of *Bdellovibrio bacteriovorus*

2.2 固定化工艺的单因素试验研究

2.2.1 不同海藻酸钠浓度对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同海藻酸钠浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响结果如图 2 所示。海藻酸钠浓度在 1% ~ 2% 时,活菌数对数值随着海藻酸钠浓度的增加而增加。当海藻酸钠浓度为 2% 时,活菌数对数值达到最大值为 7.22;当提高至 3% 以后,活菌数对数值出现下降趋势。

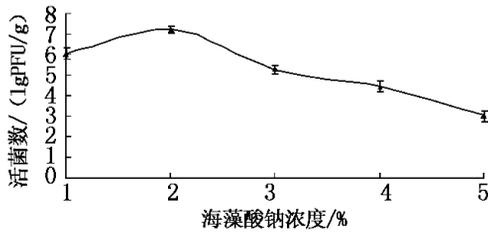


图 2 海藻酸钠浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响(n = 3)
Fig. 2 The effects of the sodium alginate concentration on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.2 不同氯化钙浓度对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同氯化钙浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响结果如图 3 所示。氯化钙浓度 6% 时,活菌数对数值达到最高值;浓度低于 6% 时,活菌数对数值随其增大而增加,超过 6% 时,活菌数对数值开始下降。

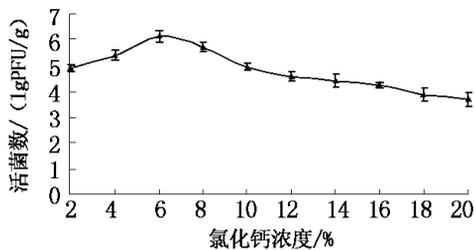


图 3 氯化钙浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响(n = 3)
Fig. 3 The effects of the calcium chloride concentration on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.3 不同蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)对蛭弧菌颗粒活菌数的影响结果如图 4 所示,蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例

(V/V)在 20% ~ 50% 时,活菌数对数值随着蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)的增加而缓慢提高,当蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)达到 50% 时,活菌数对数值达到最高值 5.15;蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)超过 50% 时,活菌数对数值开始下降。

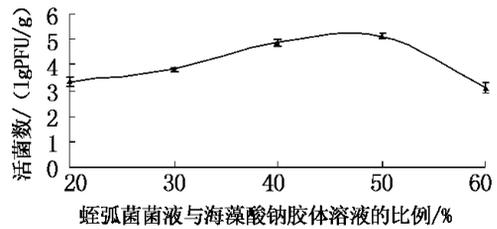


图 4 蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例对蛭弧菌颗粒活菌数的影响(n = 3)
Fig. 4 The effects of different ratios of sodium alginate colloidal solution to *Bdellovibrio bacteriovorus* solution on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.4 不同玉米油浓度对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同玉米油浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响结果如图 5 所示。试验结果表明,活菌数对数值随玉米油浓度的增加而增加,玉米油浓度为 4% 时,活菌数对数值最高达 6.78。当玉米油浓度大于 4% 时,在成本增大的同时,颗粒制备过程中操作难度加大,而且活菌数对数值出现下降趋势。

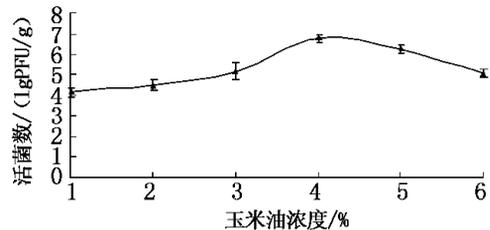


图 5 玉米油浓度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响(n = 3)
Fig. 5 The effects of corn oil concentration on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.5 不同包埋温度对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同包埋温度对颗粒内蛭弧菌活性的影响结果如图 6 所示。试验结果表明,50 ℃ 时,活菌数对数值达到 5.08;温度低于或高于 50 ℃ 时,活菌数对数值均低于此值。

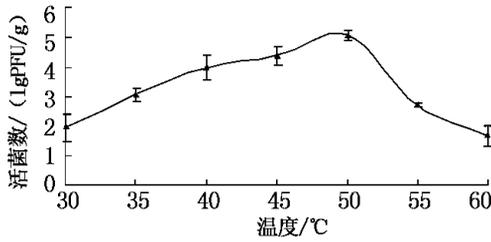


图6 温度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响 (n = 3)
Fig. 6 The effects of different temperature on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.6 不同搅拌时间对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同搅拌时间对蛭弧菌颗粒活菌数的影响如图7所示。试验结果表明,搅拌时间在10 min ~ 40 min 时,活菌数对数值随搅拌时间的增加而增加。当搅拌时间达到40 min 时,活菌数对数值达最高值为6.14。继续提高搅拌时间,活菌数对数值不再增加。

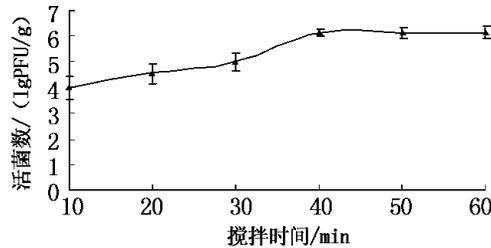


图7 搅拌时间对蛭弧菌颗粒活菌数的影响 (n = 3)
Fig. 7 The effects of stirring times on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.2.7 不同搅拌速度对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同搅拌速度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响如图8所示。试验结果表明,搅拌速度在400 r/min 时,活菌数对数值达到最大值;当搅拌速度在100 r/min ~ 400 r/min 时,活菌数对数值随着搅拌速度的增加而增加,当搅拌速度在400 r/min ~ 600 r/min 时,活菌数对数值随着搅拌速度的增加而减小。

2.2.8 不同交联时间对颗粒内蛭弧菌活性的影响

不同交联时间对蛭弧菌颗粒活菌数的影响如

图9所示。交联时间小于36 h 时,活菌数对数值随其增大而升高,最高达到5.52;超过36 h 时,活菌数对数值下降趋势明显。

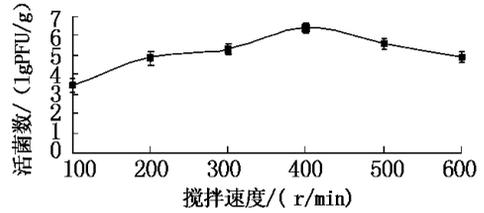


图8 搅拌速度对蛭弧菌颗粒活菌数的影响 (n = 3)
Fig. 8 The effects of stirring rate on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

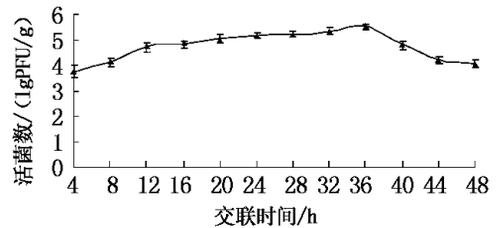


图9 交联时间对蛭弧菌颗粒活菌数的影响 (n = 3)
Fig. 9 The effects of crosslinking time on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

2.3 固定化工艺的正交试验研究

2.3.1 固定化载体配方优化

固定化载体配方优化正交试验结果见表3。根据极差分析可知:对活菌数影响最大的因素为海藻酸钠浓度,其次是玉米油浓度,而蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)和氯化钙浓度对活菌数的影响较小。固定化载体配方正交试验方差分析结果如表4,海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)和玉米油浓度的F值分别为10.76、0.82、2.23和9.72,其中海藻酸钠浓度和玉米油浓度具有显著性差异,而氯化钙浓度和蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)均无显著性差异。由此得到固定化载体配方的最佳组合为海藻酸钠浓度1.5%,氯化钙浓度6.5%,蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V)50%,玉米油浓度4.5%。在下一步的试验中,以此最佳条件为基础进行其他条件的优化。

表 3 固定化载体配方优化正交试验结果(n = 3)

Tab.3 The results of orthogonal test for optimum carrier formula of immobilization (n = 3)

试验号	A	B	C	D	E(空列)	活菌数(lgPFU/g)
1	1	1	1	1	1	5.55
2	1	2	2	2	2	5.38
3	1	3	3	3	3	5.18
4	1	4	4	4	4	4.75
5	2	1	2	3	4	5.91
6	2	2	1	4	3	5.77
7	2	3	4	1	2	6.13
8	2	4	3	2	1	7.12
9	3	1	3	4	2	5.53
10	3	2	4	3	1	5.16
11	3	3	1	2	4	6.54
12	3	4	2	1	3	5.34
13	4	1	4	2	3	5.73
14	4	2	3	1	4	5.65
15	4	3	2	4	1	5.11
16	4	4	1	3	2	4.82
K1	20.85	22.72	22.68	22.67	22.93	
K2	24.92	21.95	21.75	24.77	21.86	
K3	22.57	22.96	23.48	21.07	22.02	
K4	21.31	22.02	21.76	21.16	22.86	
R	4.07	1.01	1.73	3.70	1.07	

注: K1 是水平 1 试验组的活菌数的对数值之和; K2、K3、K4 类推。

表 4 固定化载体配方正交试验方差分析

Tab.4 The variance analysis of orthogonal test for optimum carrier formula of immobilization

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值
A	2.49	3	0.83	10.76*
B	0.19	3	0.063	0.82
C	0.52	3	0.17	2.23
D	2.25	3	0.75	9.72*
误差	0.23	3	0.08	

注: $F_{0.05(3,3)} = 9.28$; $F_{0.01(3,3)} = 29.46$; * 表示显著性差异。

2.3.2 固定化过程参数优化

固定化过程参数优化正交试验结果如表 5 所示。影响蛭弧菌活菌数最主要的因素是包埋温度,其次为搅拌速度,搅拌时间和交联时间对其影响比较小。固定化过程参数优化正交试验方差分析见表 6,温度、搅拌时间、搅拌速度和交联时间的 F 值分别为 23.64、1.91、10.00 和 2.23,其中温度和搅拌速度具有显著性差异,搅拌时间和交联时间无显著性差异。因此,以蛭弧菌活菌数为指标时在所选试验范围内最佳包埋条件为包埋温度 47.5 °C,搅拌时间 40 min,搅拌速度 450 r/min 及交联时间 36 h。以蛭弧菌的活菌数

为指标,综合考虑固定化载体配方优化及过程参数优化的结果,在海藻酸钠浓度 1.5%,氯化钙浓度 6.5%,蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的比例(V/V) 50%,玉米油浓度 4.5%,包埋温度 47.5 °C,搅拌时间 40 min,搅拌速度 450 r/min 及交联时间 36 h 的条件下进行蛭弧菌的固定化操作。

2.4 蛭弧菌颗粒剂的长期稳定性保存

不同保存时间对蛭弧菌颗粒剂活菌数的影响如图 10 所示。试验结果表明,活菌数在保存期内缓慢下降,但差异不显著($P < 0.05$),保存 8 个月后活菌数对数值降低至 6.23。

表 5 固定化过程参数优化正交试验结果 (n = 3)

Tab. 5 The results of orthogonal test for optimum parameters of immobilization (n = 3)

试验号	E	F	G	H	I(空列)	活菌数(lgPFU/g)
1	1	1	1	1	1	4.88
2	1	2	2	2	2	5.21
3	1	3	3	3	3	5.07
4	1	4	4	4	4	5.25
5	2	1	2	3	4	5.71
6	2	2	1	4	3	5.49
7	2	3	4	1	2	5.88
8	2	4	3	2	1	6.42
9	3	1	3	4	2	7.51
10	3	2	4	3	1	6.20
11	3	3	1	2	4	5.62
12	3	4	2	1	3	5.93
13	4	1	4	2	3	5.12
14	4	2	3	1	4	5.36
15	4	3	2	4	1	4.92
16	4	4	1	3	2	4.24
K1	20.41	23.22	20.23	22.05	22.42	
K2	23.50	22.26	21.77	22.37	22.84	
K3	25.26	21.49	24.36	21.22	21.61	
K4	19.64	21.84	22.45	23.17	21.94	
R	5.62	1.73	4.13	1.95	1.23	

注: K1 是水平 1 试验组的活菌数的对数值之和; K2、K3、K4 类推。

表 6 固定化过程参数优化正交试验方差分析

Tab. 6 The variance analysis of orthogonal test for optimum parameters of immobilization

因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值
E	5.20	3	1.73	23.64*
F	0.42	3	0.14	1.91
G	2.20	3	0.73	10.00*
H	0.49	3	0.16	2.23
误差	0.22	3	0.07	

注: $F_{0.05(3,3)} = 9.28$; $F_{0.01(3,3)} = 29.46$; * 表示显著性差异。

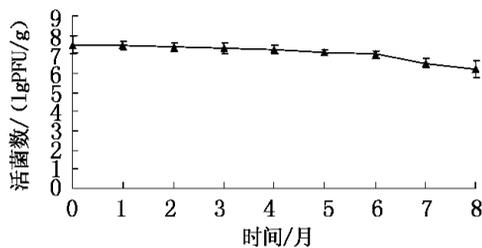


图 10 不同保存时间对蛭弧菌颗粒剂活菌数的影响 (n = 3)

Fig. 10 The effects of preservation time on survival bacterium numbers of *Bdellovibrio bacteriovorus* granules (n = 3)

3 讨论

固定化微生物具有纯化和保持高效菌种,效

率高、稳定性强和不易产生二次污染等优点,是当今微生物领域的研究热点之一^[13]。其中,包埋法因具有操作简单、对细胞影响小、固定效果好和机械强度高优点,是目前研究最多的固定化微生物技术^[14]。因此,本试验采用包埋法制备了蛭弧菌颗粒剂,并进一步优化了蛭弧菌颗粒的制备工艺,在一定程度上有助于解决目前我国蛭弧菌制剂剂型单一的困境。

海藻酸钠是包埋法广泛应用的载体,其与钙离子生成的海藻酸钙,具有成胶条件温和,固定化过程简单,生物相容性好等优点^[15]。据报道^[16],较低的海藻酸钠浓度使凝胶相对渗透性能好,更有利于底物的进入和产物的排出,本试验结果表明,蛭弧菌颗粒制备的海藻酸钠最佳浓度为 1.5%,这与王欢等^[17]制备干酪乳杆菌颗粒剂

的观点是一致的。

钙离子作为海藻酸钠包埋载体的交联剂,是决定固定化颗粒的机械强度和传质性能的重要因素^[15]。而本试验结果表明,蛭弧菌颗粒制备的最佳钙离子浓度是 6.5%,高于陈晔等^[18]制备乳酸菌颗粒剂的钙离子浓度,可能由于较高的钙离子浓度有利于海藻酸钙凝胶蛋盒结构的形成和加固而提高了蛭弧菌的活菌含量^[19]。

玉米油的添加可减小微生物细胞生长的空间位阻,提高传质性能,从而使细胞均匀生长^[20]。本试验结果表明,蛭弧菌颗粒制备的最佳玉米油浓度为 4.5%,且提高了颗粒内蛭弧菌的活菌含量。这是由于海藻酸钠溶液中添加的玉米油组分使菌体分散在玉米油的同时,再经海藻酸钠薄层包埋而得到支撑的框架利于其生长和代谢活动。此外,颗粒内部由于玉米油的存在疏松多孔,提高了传质性能,最终使得颗粒内活菌数大大增加。

本试验结果表明,制备蛭弧菌颗粒的蛭弧菌菌液与海藻酸钠胶体溶液的最佳比例为 50%。这与姜琳等^[21]研究 ST2710 颗粒剂制备的观点是不一致的。可能充足的种子液中含有的大量酶类有助于菌体对基质的利用。此外,操作过程中发现,超过 50% 的比例使颗粒成型困难,不利于蛭弧菌活菌量的提高。

温度是影响微生物固定化的重要参数^[22]。本试验研究表明,蛭弧菌颗粒制备的最佳温度是 47.5℃,这与梁峙等^[23]、王秀娟等^[24]的试验结果均有所不同,原因是该温度有利于海藻酸钠分子间的舒展以及与钙离子的紧密结合,从而提高了蛭弧菌活菌数。

搅拌时间是影响海藻酸钠溶胶液粘度的重要因素^[22]。韩国政等^[22]研究发现,凝胶成型的搅拌时间以不超过 1 h 为宜。本试验结果表明,蛭弧菌颗粒剂制备的最佳搅拌时间为 40 min。此外,关于制备包埋颗粒剂的搅拌速度,倪学文等^[25]指出,过低的搅拌速度不能使分子充分靠近而影响分子间的混合,而过高的搅拌速度由于剪切力的作用不利于分子间的混合。本试验发现,最佳搅拌速度为 450 r/min。

交联时间是影响固定化细胞性能的因素之一^[26]。本试验结果表明,蛭弧菌颗粒制备的最佳交联时间为 36 h,这与宋昊等^[27]研究降酚菌株颗

粒剂制备的观点不一致,可能较长的交联时间有利于凝胶保护作用的充分发挥^[19]。

秦敏等^[28]研究认为,海藻酸钠可对菌体起到良好的保护作用。本试验结果表明,蛭弧菌颗粒剂长时间保存活菌数的损失较少,这与李来酉等^[29]关于包埋颗粒剂保藏时间长的观点是相同的。此外,邓璐等^[30]发现蛭弧菌水剂于 25℃ 保存 3 个月后复苏率下降至 50% 以下,而本试验结果发现,颗粒剂保存 8 个月仍能全部被检出。说明颗粒剂提高了蛭弧菌的存活率,延长了活菌常温保存期,是提高蛭弧菌稳定性和使用效果的有效方法。

参考文献:

- [1] 陈家长,简纪常,胡庚东,等. 利用有益微生物改善养殖生态环境的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(4): 33-36.
- [2] 杨淑专,黄庆辉. 海洋噬菌蛭弧菌对对虾病原菌及其他细菌的寄生作用[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 1997, 36(3): 449-453.
- [3] 杨莉,马志宏,黄文,等. 蛭弧菌对鲤感染嗜水气单胞菌预防效果的观察[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15(4): 288-292.
- [4] Pineiro S A, Sahaniuk G E, Romberg E, et al. Predation pattern and phylogenetic analysis of *Bdellovibrio naceae* from the Great Salt Lake, Utah [J]. Current Microbiology, 2004, 48(2): 113-117.
- [5] 肖美燕,徐尔尼,陈志文. 包埋法固定化细胞技术的研究进展[J]. 食品科学, 2003, 24(4): 158-161.
- [6] El-Katatny M H, Hetta A M, Shaban G M, et al. Improvement of cell wall degrading enzymes production by alginate encapsulated *Tficho-derma* spp [J]. Food Technol Biotechnol, 2003, 41(3): 219-225.
- [7] 谢冰,徐璋,徐亚同. 硝化细菌的固定化研究[J]. 上海环境科学, 2003, 22(1): 19-23.
- [8] 曹德菊,谷小伟,庞晓坤. 固定化枯草杆菌生物吸附去除水中 Cd 的研究[J]. 激光生物学报, 2005, 14(1): 17-21.
- [9] 王兰,廖丽华. 光合细菌固定化及对养殖水净化的研究[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 50-53.
- [10] 曹海鹏,杨先乐. 异育银鲫肠道噬菌蛭弧菌 BDF-H16 的分离及其对嗜水气单胞菌的裂解活性[J]. 水生生物学报, 2009, 33(5): 970-974.
- [11] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, et al. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria [J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2365-2371.
- [12] 牛天贵. 食品微生物学试验技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 1412-1413.

- [13] 程树培. 环境生物技术 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 111 - 135.
- [14] 曹亚莉, 田沈, 赵军, 等. 固定化微生物细胞技术在废水处理中的应用 [J]. 微生物学通报, 2003, 30(3): 77 - 81.
- [15] 林永波, 邢佳, 孙伟光. 海藻酸钠在重金属污染治理方面的研究 [J]. 环境科学与管理, 2007, 32(9): 85 - 88.
- [16] 谭锋, 易欣欣. 酵母细胞固定化的研究 [J]. 北京农学院学报, 1996, 11(2): 45 - 50.
- [17] 王欢, 高世伟, 徐龙权, 等. 干酪乳杆菌固定化对共轭亚油酸生物合成的影响 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 87 - 89.
- [18] 陈晔, 韩玉洁. 海藻酸钙法固定化乳酸菌发酵制备 L-乳酸的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 98 - 100.
- [19] 刘袖洞, 于炜婷, 王为, 等. 海藻酸钠和壳聚糖聚电解质微胶囊及其生物医学应用 [J]. 化学进展, 2008, 20(1): 126 - 139.
- [20] 周剑忠, 董明盛, 江汉湖. 乳酸菌细胞的液芯包囊固定化技术及应用 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 20(2): 82 - 86.
- [21] 姜琳, 方慧英, 诸葛健. 固定化 *Amycolatopsis* sp. ST 2710 转化洛伐他汀的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 19 - 21.
- [22] 韩国政, 马志泓, 吴凤霞. 固定化细胞载体物理性能的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 1990, 21(3): 239 - 242.
- [23] 梁峙, 赵孝华. 海藻酸钠固定化酵母菌的应用研究 [J]. 食品工业科技, 2002, 23(12): 34 - 35.
- [24] 王秀娟, 张坤生, 任云霞, 等. 海藻酸钠凝胶特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(2): 259 - 263.
- [25] 倪学文, 毛亚如. 魔芋葡甘聚糖-海藻酸钠复配体系协效性研究 [J]. 江苏农业科学, 2007, (3): 213 - 215.
- [26] 蒋宇红, 黄霞, 俞毓馨. 几种固定化细胞载体的比较 [J]. 环境科学, 1993, 14(2): 11 - 15.
- [27] 宋昊, 何泽超. 降酚菌株的固定化细胞处理含酚废水的性能研究 [J]. 环境污染治理技术与设备, 2005, 6(9): 37 - 40.
- [28] 秦敏, 杨宗兴, 雄小玲, 等. 应用海藻糖冻干保存幽门螺杆菌菌种 [J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16(6): 368 - 369.
- [29] 李来酉, 赵敏, 张帆, 等. 两歧双歧杆菌微囊化及其性质研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(7): 141 - 144.
- [30] 邓璐, 杨先乐, 李圆圆, 等. 噬菌蛭弧菌 BDF-H16 长期简易保藏方法研究 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(6): 714 - 720.