



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105238722 B

(45)授权公告日 2018.09.21

(21)申请号 201510733305.8

(22)申请日 2015.11.03

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105238722 A

(43)申请公布日 2016.01.13

(83)生物保藏信息
CCTCC M 2015602 2015.10.12

(73)专利权人 江苏省苏微微生物研究有限公司
地址 214063 江苏省无锡市钱荣路7号
专利权人 宜兴市天石饲料有限公司
无锡中水渔药有限公司

(72)发明人 孙梅 张维娜 陈秋红 高亮
施大林 匡群 张宪中 邹益东
(续)

(74)专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104
代理人 时旭丹 张仕婷

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A23K 10/18(2016.01)

A23K 50/80(2016.01)

(续)

(56)对比文件

CN 103966118 A,2014.08.06,

US 6171847 B1,2001.01.09,

CN 104195067 A,2014.12.10,

CN 101544993 A,2009.09.30,

CN 102719383 A,2012.10.10,

CN 103045498 A,2013.04.17,

张娟等.解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用.《动物营养学报》.2014,第26卷(第4期),第863-867页.

曹海鹏等.具有降解亚硝酸盐活性的解淀粉芽孢杆菌的分离与安全性分析.《环境污染与防治》.2013,第35卷(第6期),第16-21页.

审查员 唐亚丽

权利要求书1页 说明书7页

序列表2页 附图1页

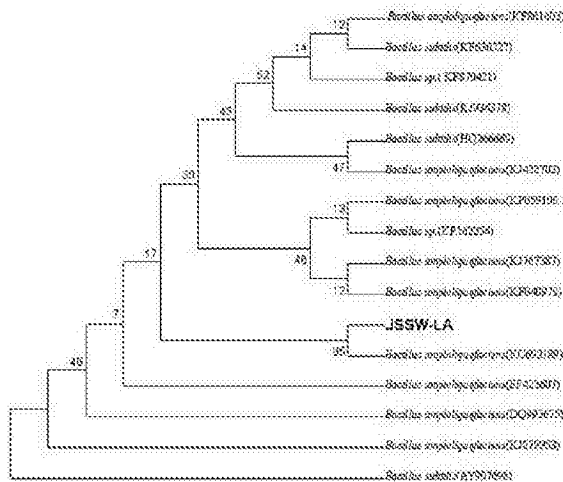
(54)发明名称

一株解淀粉芽孢杆菌菌株及其菌粉制剂的制备方法和应用

(57)摘要

一株解淀粉芽孢杆菌菌株及其菌粉制剂的制备方法和应用,属于微生物技术领域。本发明筛选得到一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),JSSW-LA,保藏单位:中国典型培养物保藏中心,保藏号:CCTCC NO:M 2015602。通过冷冻菌种活化、发酵培养和菌粉制备得到解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂,可应用于渔业养殖饲料的添加剂或水产养殖水质改良剂。本发明提供的解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA能够有效抑制温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌、爱德华氏菌的生长,其中对温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌的抑制效果优于其他种类致病菌。因此,在水产养殖中使用JSSW-LA菌粉制剂能够有效防控由病原菌引发

的水产养殖动物病害,特别是细菌性出血病,从而保护水生动物健康生长。



CN 105238722 B

[接上页]

(72)发明人 夏冬

C12R 1/07(2006.01)

(51)Int.Cl.

C02F 103/20(2006.01)

C02F 3/34(2006.01)

1. 一株解淀粉芽孢杆菌菌株, 分类命名为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) JSSW-LA, 保藏单位: 中国典型培养物保藏中心, 保藏日期为2015年10月12日, 保藏号: CCTCC NO: M 2015602。

2. 权利要求1所述解淀粉芽孢杆菌菌株的菌粉制剂的制备方法, 其特征在于步骤如下:

(1) 菌种活化: 无菌开启解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA的冻干保藏菌种, 划线接种于营养琼脂试管斜面, 于30-37℃培养24-48h, 然后划线转接于营养琼脂茄子瓶斜面, 30-37℃培养24-48h; 镜检, 当90%以上菌体形成芽孢时, 即为成熟; 反复活化2-3次, 得到种子菌悬液;

斜面培养基组成以g/L计: 蛋白胨 10, 牛肉膏3, NaCl 5, 琼脂 15-20, 以蒸馏水定容配制, pH 7.0-7.2;

(2) 发酵培养: 将步骤(1)所得种子菌悬液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的三角瓶中, 三角瓶装液量为体积比10%-20%, 转速为100-180 rpm, 30-37℃恒温振荡培养20-24h, 得到发酵液;

发酵培养基组成以g/L计: 麸皮 10-50, 以蒸馏水定容配制, pH 7.0;

(3) 菌粉制剂制备: 将步骤(2)所得发酵液10000rpm高速离心收集湿菌体, 湿菌体与干淀粉或玉米芯以质量比1:2-10进行混合, 在30-50℃下干燥20-24h, 粉碎机粉碎, 过0.9mm筛, 获得的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂, 其菌浓度不低于 5.0×10^8 CFU/g。

3. 权利要求2制备得到的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的应用, 其特征在于: 用作渔业养殖饲料的添加剂, 在饲喂基础日粮中添加 $1.0-5.0 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂。

4. 权利要求2制备得到的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的应用, 其特征在于: 用作水产养殖水质改良剂, 按50-200g/亩·米的用量全池泼洒解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂。

一株解淀粉芽孢杆菌菌株及其菌粉制剂的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株解淀粉芽孢杆菌菌株及其菌粉制剂的制备方法和应用,属于微生物技术领域。

背景技术

[0002] 近年来,我国水产养殖业蓬勃发展,但随着高密度集约化养殖规模日益扩大,养殖水体生态环境日益恶化,极大地增加了水产动物之间病原体交叉感染的机会。淡水鱼类细菌性出血病是我国养鱼史上危害鱼类最严重的一种急性传染病,常导致养殖和野生鱼类的大量死亡,造成水产养殖的严重损失。嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、温和气单胞菌(*A. sobria*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)是细菌性出血病主要病原体,它们存在于水、土壤、水生动物体中,能够感染淡水主要养殖品种,如鲫、团头鲂、鲤、鳙、鲢等淡水主要养殖鱼类。其中嗜水气单胞菌为条件致病菌,常会与温和气单胞菌、弧菌等混合感染使病情加重。近年来南方淡水养殖鱼类流行暴发性传染病,其中许多报道系为鱼类细菌性出血病,因此,寻求安全、高效、生态的鱼病防治方法迫在眉睫。

[0003] 针对鱼病的防治,传统的方法是使用抗生素等化学药物,由于抗生素的长期使用容易导致病原菌的耐药性越来越强,水生动物肠道内菌群失衡,长期富集在体内通过食物链影响人类健康等弊端,因此其在水产养殖的应用在国内外受到极大的限制。有研究显示微生态制剂可有效控制水产养殖的各种感染性疾病,包括由迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)在欧洲鳗鲡(*Anguilla australis*)中引起的爱德华氏菌病、由鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)在大西洋鲑鱼中引起的疾病等。微生态制剂是一类能够抑制病原微生物、改善养殖生态环境、调节动物体内生态平衡、增强免疫力、提高饲料利用率的有益微生物,将微生态制剂应用于水产养殖能够有效避免服用抗生素所造成的耐药性和二次感染等,其凭借独特的调节肠道菌群的功能而备受世人瞩目。

[0004] 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是我国农业部公告第2045号《饲料添加剂目录2013》中淀粉酶和 β -葡聚糖酶的生产菌种,也是我国免作毒理学试验的微生物肥料安全菌种。它具有以下特点:该菌在自然界分布广泛,对人畜无毒无害,不污染环境,生长快,稳定性好,并且其代谢产物较为丰富,具有广谱抗菌活性和较强的抗逆能力;活菌体内的代谢产物中含有较高的淀粉酶、 β -葡聚糖酶,能增加动物的体液免疫和细胞免疫,增强机体的免疫调节活性,促进生长;可减少残饵对水体环境造成的污染,降低水体中氮、磷的含量,从而防止水体富营养化。本发明采用低成本发酵方法获得具有多种水产病原菌拮抗活性的高浓度解淀粉芽孢杆菌的芽孢制剂,该制剂具有环境抗逆性强、抗胃酸、抗干燥、易贮存等独特的生物特性。

[0005] 目前,解淀粉芽孢杆菌应用于淡水养殖方面的专利很少,习丙文等从大宗淡水鱼肠道、水环境、底泥中分离筛选得到一株对嗜水气单胞菌具有拮抗作用的解淀粉芽孢杆菌FFRC-S24,并通过培养作为益生菌添加制剂添加入饲料或药物中。该专利中的解淀粉芽孢杆菌拮抗作用单一,对水产常见病原菌不具有广谱拮抗作用。本发明涉及解淀粉芽孢杆菌

JSSW-LA在淡水养殖中对多种水产常见病原菌有广谱拮抗作用,同时该菌株还兼具养殖环境控制功能和提高水生动物机体免疫力的特点,是一种新型的多功能微生物。目前尚无解淀粉芽孢杆菌此方面的专利报道。

[0006] 在淡水养殖中应用该菌株制备的微生态制剂能够高效调控水质、防治疾病、提高水生动物免疫力,满足水产养殖对疾病防控、水体生态环境治理和健康养殖的高度需求。在淡水生态健康养殖推广应用,与传统的以药物使用为主的水质调控和病害防治技术相比,微生态制剂具有主动预防,无毒、无残留,无污染的优点,对形成良好的养殖生态环境,减少养殖污水的排放,消除水产品中药物的残留,保护环境具有重要意义。同时作为水产饲料添加剂能够有效促进水产养殖动物健康生长,带动水产养殖经济效益的提高,促进水产养殖户增产增收。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种对水产养殖常见病原菌具有拮抗作用、能够净化养殖水体、提高水生动物免疫力的解淀粉芽孢杆菌菌株,及其菌粉制剂的制备方法和应用。

[0008] 本发明的技术方案,一种解淀粉芽孢杆菌菌株,分离自池塘底泥,该菌株的保藏名称为:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JSSW-LA,保藏单位:中国典型培养物保藏中心,保藏号:CCTCC NO: M 2015602。本发明的解淀粉芽孢杆菌菌株JSSW-LA,革兰氏阳性菌,镜检呈杆状,芽孢膨大。在LB平板上菌落直径为0.5-1.0mm,形态规则,表面光滑、不透明、无色素。在LB培养基上可得大量圆形、表面光滑、不透明、白色的菌落。

[0009] 所述解淀粉芽孢杆菌菌株的菌粉制剂的制备方法,步骤如下:

[0010] (1)菌种活化:无菌开启解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA的冻干保藏菌种,划线接种于营养琼脂试管斜面,于30-37℃培养24-48 h,然后划线转接于营养琼脂茄子瓶斜面,30-37℃培养24-48h。镜检,当90%以上菌体形成芽孢时,即为成熟;反复活化2-3次,得到种子菌悬液;

[0011] 斜面培养基组成以g/L计:蛋白胨 10,牛肉膏3,NaCl 5,,琼脂 15-20,以蒸馏水定容配制,pH 7.0-7.2。

[0012] (2)发酵培养:将步骤(1)所得种子菌悬液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的三角瓶中,三角瓶装液量为体积比10%-20%,转速为100-180 rpm,30-37℃恒温振荡培养20-24h,得到发酵液;

[0013] 发酵培养基组成以g/L计:麸皮 10-50,以蒸馏水定容配制,pH 7.0。

[0014] a、抑菌性测定:将无菌滤纸片在浓度约为 10^7 CFU/mL解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA新鲜发酵液中浸泡1.0 h。分别取浓度约 10^6 CFU/mL的水产养殖中常见致病菌嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌、爱德华氏菌、鳃利斯顿氏菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌、溶藻弧菌的液体培养液0.1 mL,分别涂布于LB琼脂培养基平皿上,然后将浸泡过菌液的滤纸片贴于培养皿上,每个平皿贴3片,每个平皿做3个重复。平皿置于25-30℃培养箱中24、48 h,测量抑菌圈大小。

[0015] b、胞外酶活性测定:将解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA分别点种于含有脱脂牛奶、淀粉、植物油、羧甲基纤维素钠的LB平板中,测定该菌株蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶的胞外酶活性。于35-37℃恒温培养 24h-48h后观察,含脱脂牛奶、植物油、羧甲基纤维素钠的平板

可以直接观察水解圈;含淀粉的平板侧在观察之前滴加 I_2 -KI溶液(革兰氏染色用卢戈尔氏液),若细菌具有淀粉酶,则淀粉被分解,不与碘发生反应,菌落周围培养基变透明,如细菌不具有淀粉酶,则培养基中的淀粉与碘发生反应出现紫色。

[0016] (3)解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的制备:菌种JSSW-LA活化后经发酵培养得到的发酵液10000rpm高速离心收集湿菌体,湿菌体与干淀粉或玉米芯以质量比1:2-10进行混合,在30-50℃下干燥20-24h,粉碎机粉碎,过0.9mm筛,获得的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂,其菌浓度不低于 5.0×10^8 个(CFU)/克。

[0017] 用所述方法制备的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的应用,用作渔业养殖饲料的添加剂,在饲喂基础日粮中添加1.0-5.0mg·kg⁻¹的解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂;用作水产养殖水质改良剂,按50-200g/亩·米的用量全池泼洒解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂。

[0018] 本发明的有益效果:解淀粉芽孢杆菌 JSSW-LA能够有效抑制温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、维氏气单胞菌、爱德华氏菌的生长,其中对温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌的抑制效果优于其他种类致病菌。因此,在水产养殖中使用解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA制剂能够有效防控由病原菌引发的水产养殖动物病害,特别是细菌性出血病,从而保护水生动物健康生长。

[0019] 解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA菌粉制剂作为渔业养殖饲料添加剂能够显著提高水生动物机体免疫力。解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA菌粉制剂作为水产养殖用水质改良剂能够有效降低水体中的污染物含量,改善养殖水质。

[0020] 生物材料样品保藏:一株解淀粉芽孢杆菌菌株,分类命名为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) JSSW-LA,保藏单位:中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学,保藏日期为2015年10月12日,保藏号:CCTCC NO:M 2015602。

附图说明

[0021] 图1是菌株分子发育树。

具体实施方式

[0022] 实施例1:拮抗菌种的筛选

[0023] 样品采集于无锡鹅湖青鱼池塘,称取池塘底泥10g于装有90mL无菌水及少量玻璃珠的250mL三角瓶中,振荡30min,37℃培养7天。每个样品吸取1.0mL,80℃加热10min,取移液枪吸取0.1mL于营养琼脂上,涂布,37℃培养。选取生长良好的菌落分离纯化3次,得到单菌落。

[0024] 取指示菌(嗜水气单胞菌、温和气单胞菌)0.1mL均匀涂布于LB平板上,将上述单菌落点种此平板,放入25-30℃恒温培养箱中培养48h,结果显示编号为JSSW-LA的菌株对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌均具有拮抗作用,产生明显透明抑菌圈。

[0025] 实施例2:菌种鉴定

[0026] (1)形态特征:菌株 JSSW-LA,革兰氏染色为阳性,镜检呈杆状,细胞直径1-2μm,能形成芽孢。在LB培养基上可得大量圆形、表面光滑、不透明、白色的菌落。

[0027] (2)生化特性:菌株JSSW-LA,革兰氏染色为阳性,接触酶、氧化酶、VP试验、为阳性,能水解淀粉、明胶、酪素,能在50℃环境下生长。β-半乳糖苷酶为阴性。

[0028] 生长实验结果显示该菌株能利用 α -D-葡萄糖、D-果糖、D-山梨醇、D-甘露醇、甘油、 α -D-乳糖、D-海藻糖、龙胆二糖、蔗糖、果胶，L-乳酸、柠檬酸、L-苹果酸、溴代丁二酸、L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、N-乙酰- β -D-葡糖胺反应为阳性。

[0029] 化学敏感实验结果显示，该菌株对萘啶酸、林可霉素、二甲胺四环素、夫西地酸、十四烷硫酸钠、D-丝氨酸、万古霉素、醋竹桃霉素、利福霉素SV、丁酸钠、溴酸钠、四唑蓝、四唑紫、氨曲南敏感，对1%乳酸钠、盐酸胍、氯化锂、亚碲酸钾、1% NaCl、4% NaCl、8% NaCl不敏感，能够在pH5.0、pH6.0环境下生长。

[0030] (3) 遗传学特征：菌株JSSW-LA的16S rRNA基因序列，如SEQ ID NO.1所示；与从GenBank中已知的核酸序列进行Blast分析，挑选同源性较高的序列在Cluster X软件完成序列比对，比对结束后使用MEGA 4.1软件构建系统发育树。

[0031] 菌株JSSW-LA基因序列测序结果：16S rRNA 基因长度为1463 bp，将菌株所扩增的16S rRNA基因序列在NCBI通过Blast进行同源性检索，结果检索出为芽孢杆菌属的16S rRNA基因序列，采用邻接法构建菌株分子发育树，分离菌株在系统发育树上与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) (登录号:KC692189) 属同一支，同源性达99%以上(见图1)。结合形态学和生理生化特征将所分离菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

[0032] 实施例3: 抑菌性测定

[0033] 将无菌滤纸片在浓度为 3.0×10^7 CFU/mL解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA新鲜培养液中浸泡1.0h。取浓度约 5.0×10^6 CFU/mL的水产养殖中常见致病菌嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、爱德华氏菌、维氏气单胞菌、鳗利斯顿氏菌、副溶血性弧菌、溶藻弧菌、大肠杆菌的液体培养液0.1mL，分别涂布于LB琼脂培养基平皿上，然后将浸泡过菌液的滤纸片贴于培养皿上，每个平皿贴3片，每个平皿做3个重复。平皿置于28℃培养箱中24h、48h，测量抑菌圈大小。

[0034] 测定结果如表1所示：

[0035] 表1解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA抑菌性测定结果(抑菌圈直径:mm)

[0036]

	24 h	48 h
嗜水气单胞菌	8.61±3.24	9.41±2.05
温和气单胞菌	16.73±0.39	17.11±1.21
豚鼠气单胞菌	10.31±1.41	12.95±0.26
爱德华氏菌	7.78±0.29	8.31±1.01
维氏气单胞菌	8.21±1.21	8.44±0.64
鳗利斯顿氏菌	-	-
副溶血性弧菌	-	-
溶藻弧菌	-	-
大肠杆菌	-	-

[0037] 注：“-”表示无抑菌圈，纸片直径为7.00 mm。

[0038] 由表1可知，解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、维氏气单胞菌、豚鼠气单胞菌、爱德华氏菌均具有一定的拮抗作用，尤其对温和气单胞菌、豚鼠气单胞

菌的抑制效果最为显著。

[0039] 实施例4:胞外酶活性

[0040] 将解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA分别点种于含有脱脂牛奶(10%)、淀粉(1%)、植物油(1%)、羧甲基纤维素钠(2‰)的LB平板中,测定该菌株蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶的胞外酶活性,37℃培养48h,测定透明圈直径。

[0041] 表2 解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA胞外酶活性测定结果

酶活直径 (mm)			
蛋白酶	淀粉酶	纤维素酶	脂肪酶
15.3±1.1	19.0±1.5	5.0±0.2	7.2±0.9

[0043] 表2结果显示,解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA能够分泌蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶,其中淀粉酶、蛋白酶的活性较高。

[0044] 实施例4:解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的制备

[0045] (1) 菌种活化:无菌开启解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA的冻干保藏菌种,划线接种于营养琼脂试管斜面,于30-37℃培养24-48h,然后划线转接于营养琼脂茄子瓶斜面,30-37℃培养24-48h;镜检,当90%以上菌体形成芽孢时,即为成熟;反复活化2-3次,得到种子菌悬液;

[0046] 斜面培养基组成以g/L计:蛋白胨 10,牛肉膏3,NaCl 5,,琼脂 15-20,以蒸馏水定容配制,pH 7.0-7.2;

[0047] (2) 发酵培养:将步骤(1)所得种子菌悬液以体积比1%-10%接种量接入装有发酵培养基的三角瓶中,三角瓶装液量为体积比10%-20%,转速为100-180 rpm,30-37℃恒温振荡培养20-24h,得到发酵液;

[0048] 发酵培养基组成以g/L计:麸皮 10-50,以蒸馏水定容配制,pH 7.0;

[0049] (3) 菌粉制备:将步骤(2)所得发酵液10000rpm高速离心发酵液收集湿菌体,湿菌体与玉米淀粉以质量比1:2~10进行混合,在30~50℃下低温干燥20~24h,粉碎机粉碎,过0.9mm筛,获得的菌粉浓度不低于 5.0×10^8 个(CFU)/g。

[0050] 实施例5:解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂的养殖应用

[0051] 试验用异育银鲫幼鱼采用循环流水控温系统进行养殖。试验选择健康、规格、重量基本一致的异育银鲫,初始体重为(20.1±0.07)g的异育银鲫随机分为3组,每组3个平行,每个平行30尾鱼。对照组饲喂基础日粮为鲫鱼商品料。试验组日粮为基础日粮分别添加1.0~5.0mg·kg⁻¹解淀粉芽孢杆菌制剂(实施例4中制备)。

[0052] 饲养管理:试验前,先用基础饲料驯养2周后进行正式试验。试验期间,每天投喂2次(8:00-8:30,15:30-16:00),直至表观饱食为止,日投饵量为鱼体重的3%-4%,并且根据生长和摄食的情况作适当调整。每日定时测定水温、pH、氨氮、溶氧,养殖期间水温为26.5℃左右,pH7.6~7.8,溶氧大于5 mg/L,氨氮小于0.01mg/L。试验周期为60 d。

[0053] 样品的收集与处理:采样前禁食24h,每个桶随机选取3尾鱼,每组9尾异育银鲫幼鱼,尾静脉采血,血液于4℃条件下10000r/min离心5min,制备得到的血清于-20℃冻存备用。

[0054] 表3 解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA对异育银鲫血清生化指标的影响

血清生化指标	解淀粉芽孢杆菌添加量/%			
	0.0	0.1	0.3	0.5
碱性磷酸酶 ALP/(U/L)	4.27±0.72 ^a	5.38±2.05 ^a	11.29±1.71 ^b	13.32±5.88 ^b
总蛋白 TP/(g/L)	32.45±5.02 ^a	29.71±1.32 ^a	43.21±2.46 ^b	47.12±4.10 ^b
[0055] 总胆固醇 TC/(mmol/L)	4.75±1.11	4.28±0.62	4.41±1.39	4.48±1.62
甘油三酯 TG/(mmol/L)	2.17±0.28	2.21±0.26	2.27±0.22	2.60±0.73
葡萄糖 GLU/(mmol/L)	16.92±6.30	17.29±3.31	18.21±3.92	16.42±3.71
谷草转氨酶 AST/(U/L)	111.82±8.32 ^a	101.31±8.84 ^a	81.61±3.25 ^b	72.41±4.19 ^b
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	4.06±1.26 ^a	4.25±1.14 ^a	1.49±0.23 ^b	1.02±0.23 ^b

[0056] 注:同行无字母或肩标相同字母差异不显著($P > 0.05$),不同字母差异显著($P < 0.05$)。

[0057] 由表3可知,添加0.3%、0.5%解淀粉芽孢杆菌试验组血清中ALP、TP含量均显著高于0.1%解淀粉芽孢杆菌试验组及对照组($P < 0.05$),而添加0.1%解淀粉芽孢杆菌试验组ALP、TP含量与对照组无显著差异($P > 0.05$)。添加0.3%、0.5%解淀粉芽孢杆菌试验组血清中AST、ALT含量均显著低于0.1%解淀粉芽孢杆菌试验组及对照组($P < 0.05$)。

[0058] 在饲料中添加0.1%、0.3%、0.5%解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂试验组异育银鲫幼鱼血清中TC、TG、GLU含量均无显著差异($P > 0.05$)。

[0059] 因此,解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂作为水产饲料添加剂能显著增强异育银鲫血液的非特异性免疫因子能力。

[0060] 实施例6:解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂净化水质方面的应用

[0061] 随机选取养殖虾塘6个,3个为试验组,3个为对照组。试验组为按100g/亩·米的用量全池泼洒解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂,使进入水体中的解淀粉芽孢杆菌起始菌浓约为 10^2 - 10^3 CFU/mL,连续泼洒一周。对照组为不泼洒解淀粉芽孢杆菌菌粉制剂。试验周期为1周,试验前、后分别采样,检测各项水质指标。

[0062] 表4 解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA对养殖青鱼池塘水质的影响

指标	试验前	试验后	
		对照组	试验组
COD	60.42±2.32 ^a	65.58±2.27 ^a	38.31±2.25 ^b
氨氮	4.24±0.54 ^a	4.98±0.62 ^a	1.68±0.22 ^b
亚硝酸盐	0.88±0.24 ^a	0.91±0.05 ^b	0.32±0.10 ^c
总磷	6.93±0.52 ^a	7.88±0.59 ^a	3.23±0.13 ^b
磷酸盐	5.17±0.26 ^a	5.03±0.13 ^a	2.08±0.20 ^b
总氮	6.46±0.33 ^a	6.68±0.47 ^a	2.56±0.10 ^b

[0063]

[0064] 注:同一行数据中有不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

[0065] 从表4中可以看出,试验组各项水质指标较试验前均显著降低($P<0.05$),且明显低于对照组($P<0.05$)。因此,可以说明解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA能够有效降低水体中的污染物含量,改善养殖水质,能够作为水质净化剂应用于水产养殖。

[0001] SEQ ID NO.1
[0002] < 210 > 1
[0003] < 211 >1463
[0004] < 212 > RNA
[0005] < 213 >解淀粉芽孢杆菌JSSW-LA的16S rRNA基因序列表
[0006] < 400 > 1
[0007] TATACATGCA AGTCGAGCGG ACAGATGGGA GCTTGCTCCC TGATGTTAGC GCGGACGGG 60
[0008] TGAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA CTCCGGGAAA CCGGGGCTAA 120
[0009] TACCGGATGC TTGTTTGAAC CGCATGGTTC AGACATAAAA GGTGGCTTCG GCTACCACTT 180
[0010] ACAGATGGAC CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA CGGCTACCA AGGCGACGAT 240
[0011] GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT 300
[0012] ACGGGAGGCA GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCGC 360
[0013] GTGAGTGATG AAGGTTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTT AGGGAAGAAC AAGTGCCGTT 420
[0014] CAAATAGGGC GGCACCTTGA CGGTACCTAA CCAGAAAGCC ACGGCTAACT ACGTGCCAGC 480
[0015] AGCCGCGGTA ATACGTAGGT GGCAAGCGTT GTCCGGAATT ATTGGGCGTA AAGGGCTCGC 540
[0016] AGGCGGTTTC TTAAGTCTGA TGTGAAAGCC CCCGGCTCAA CCGGGGAGGG TCATTGGAAA 600
[0017] CTGGGGA ACT TGAGTGCAGA AGAGGAGAGT GGAATTCCAC GTGTAGCGGT GAAATGCGTA 660
[0018] GAGATGTGGA GGAACACCAG TGGCGAAGGC GACTCTCTGG TCTGTA ACTG ACGCTGAGGA 720
[0019] GCGAAAGCGT GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCACGCCG TAAACGATGA 780
[0020] GTGCTAAGTG TTAGGGGGTT TCCGCCCTT AGTGCTGCAG CTAACGCATT AAGCACTCCG 840
[0021] CCTGGGGAGT ACGGTCGCAA GACTGAACT CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG 900
[0022] GTGGAGCATG TGTTTAATT CGAAGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGTCT TGACATCCTC 960
[0023] TGACAATCCT AGAGATAGGA CGTCCCCTTC GGGGGCAGAG TGACAGGTGG TGCATGTTG
1020
[0024] TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTGATCT
1080
[0025] TAGTTGCCAG CATTCA GTTG GGC ACTCTAA GGTGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG
1140
[0026] TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG
1200
[0027] GCAGAACAAA GGGCAGCGAA ACCGCGAGGT TAAGCCAATC CCACAAATCT GTTCTCAGTT
1260
[0028] CGGATCGCAG TCTGCAACTC GACTGCGTGA AGCTGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC
1320
[0029] ATGCCGCGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC ACGAGAGTTT
1380
[0030] GTAACACCCG AAGTCGGTGA GGTAACCTTT TTGGAGCCAG CCGCCGAAGG TGGGACAGAT
1440

[0031] GATTGGGGTG AAGTCGTAAG CAA 1463

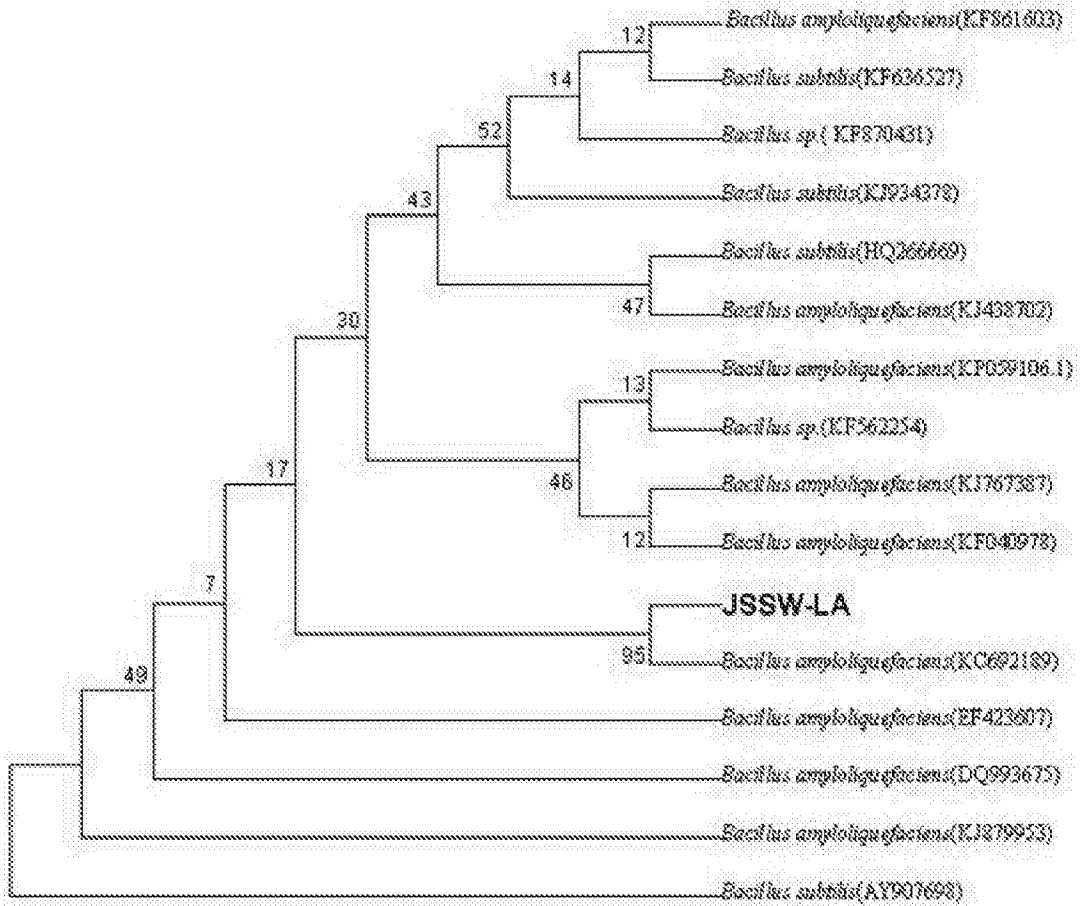


图1